



INSTITUTO POLITÉCNICO  
DE VIANA DO CASTELO

Francisco Manuel Garcia Beleza Vaz

Reação hospedeira de cultivares de porta-enxerto de tomateiro ao  
nemátode-das-galhas-radiculares *Meloidogyne incognita*

Mestrado em Agricultura Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de

Doutora Sofia Rocha Costa

Professora Doutora Isabel de Maria Mourão

Ponte de Lima

Novembro de 2017

As doutrinas expressas neste  
trabalho são da exclusiva  
responsabilidade do autor

# ÍNDICE

Resumo .....	iii
Abstract.....	v
Agradecimentos .....	vii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	viii
Lista de quadros.....	ix
Lista de figuras .....	x
1. Introdução .....	1
1.1. A cultura do tomateiro .....	1
1.2 Nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR) na cultura do tomateiro .....	5
1.2.1. Proteção de culturas contra o ataque de NGR.....	11
Controlo químico.....	13
Controlo biológico.....	15
Controlo cultural.....	19
Controlo genético .....	21
1.3 Enxertia de hortícolas .....	23
Conceito de enxertia de hortícolas.....	23
Objetivos da enxertia herbácea.....	24
A enxertia de culturas hortícolas na Europa.....	25
A enxertia de culturas hortícolas em Portugal.....	26
Propriedades de um porta-enxerto .....	27
Porta-enxertos de tomateiro e o gene “Mi” .....	27
1.4. Objetivos do trabalho.....	30
2. Materiais e Métodos .....	32

2.1 Manutenção da população de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	32
2.2 Avaliação da reação hospedeira de cultivares de porta-enxerto de tomateiro a <i>Meloidogyne incognita</i> .....	32
2.2.1 Obtenção do inóculo .....	32
2.2.2 Obtenção das plantas .....	33
2.2.3 Desenho experimental .....	34
2.2.4. Parâmetros avaliados .....	35
2.2.5 Índices de reação hospedeira .....	36
2.3. Análise estatística .....	39
3. Resultados.....	40
3.1. Parâmetros nematológicos .....	40
3.2. Parâmetros da planta .....	42
3.3. Registos do estado fitossanitário das plantas do ensaio do laboratório .....	47
4. Discussão e conclusão .....	48
Referências bibliográficas .....	51
Anexos.....	62

## Resumo

Os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), *Meloidogyne* spp., são parasitas obrigatórios de elevado impacto económico a nível mundial, e causam perdas na quantidade e qualidade da produção de diversas culturas hortícolas. Entre as culturas afetadas pelos NGR, o tomateiro, *Solanum lycopersicum*, é considerado um ‘hospedeiro universal’, podendo ocorrer uma quebra de produção até 100%, em condições de cultura protegida de tomate para consumo em fresco. As infestações de NGR foram tradicionalmente controladas através da aplicação de nematodocidas de síntese, que têm vindo a ser banidos devido à sua elevada toxicidade. Considerando os meios sustentáveis de proteção de culturas hortícolas, a utilização de porta-enxertos tolerantes/resistentes é uma prática promissora para o controlo de algumas doenças de origem edáfica e tem-se vulgarizado na cultura protegida de tomateiro nos últimos anos.

O objetivo deste estudo foi o de conhecer a reação de cultivares comerciais de porta-enxertos de tomateiro, designados pelas empresas produtoras como tendo resistência parcial ou intermédia a *M. incognita*. Assim, foram realizados ensaios em vasos com sete cultivares, sendo elas, as cvs. Auroch, Emperador, KingKong, Maxifort, Actimino, Multifort e Silex e com a cv. Moneymaker e Coração de Boi como testemunhas, em condições controladas seguindo metodologias padrão de avaliação da reação hospedeira de tomateiro a NGR. Sessenta dias após a inoculação, os números de galhas e massas de ovos e a população final foram determinados, sendo assim calculados o índice de galhas, o índice de massas de ovos, o fator de reprodução e o índice de reprodução relativa. Foram ainda registados os parâmetros de altura, número de folhas, pesos frescos e pesos secos da parte aérea e radicular das plantas.

Os números de galhas e de massas de ovos no tomateiro cv. Moneymaker (testemunha) foi significativamente superior aos dos porta-enxertos. No entanto, o fator de reprodução do nemátode nas raízes do porta-enxerto cv. KingKong ( $12,2 \pm 2,5$ ) foi comparável ao obtido na cv. Moneymaker ( $13 \pm 2,5$ ); sendo ainda superior no porta-enxerto cv. Maxifort ( $22,4 \pm 3,6$ ) ( $p < 0.05$ ). As plantas das cultivares Coração de boi, King kong e Moneymaker atingiram alturas significativamente mais reduzidas quando inoculadas com os nemátodes. A partir da avaliação do fator de reprodução e do índice de galhas concluiu-se que, com a exceção da cv. Silex, todas as cvs. testadas foram suscetíveis a *M. incognita* de acordo com a classificação padrão. No entanto, várias das cultivares testadas conjugaram índices de reprodução inferiores a 25% com um número de galhas e de

massas de ovos inferior às testemunhas suscetíveis (Actimino, Auroch, Emperador, Multifort e Silex;  $p < 0.05$ ), pelo que reúnem indicadores de reação hospedeira mais desejáveis.

Face aos resultados obtidos, será importante caracterizar a reação hospedeira dos porta-enxertos comerciais de tomateiro, geralmente considerados como parcialmente resistentes a NGR. A terminologia usualmente empregue pelas casas de sementes de ‘resistência intermédia’ ou ‘resistência parcial’ poderá ser interpretada como indicativa da redução dos números de galhas nas raízes, mas não parece refletir a eficiência hospedeira das plantas, que poderão permitir o aumento populacional dos NGR.

**Palavras-chave:** controlo sustentável de doenças, fator de reprodução, resistência, *Solanum lycopersicum*, suscetibilidade.

## Abstract

Root-knot nematodes (RKN), *Meloidogyne* spp., are obligate parasites with a high economic impact worldwide and cause losses in the quantity and quality of several vegetable crops. Among these crops affected by RKN, tomato, *Solanum lycopersicum*, is considered a “universal host”, and a yield loss up to 100% can occur under protected conditions for fresh consumption.

Infestations of RKN have traditionally been controlled through the application of synthetic nematocides, which have been banned because of their high toxicity. Considering the sustainable means of protection of horticultural crops, the use of tolerant/resistant rootstocks is a promising practice for the control of some soil borne diseases and has been widely used in the protected tomato crop production in recent years. The objective of this study was to know the reaction of commercial cultivars of tomato rootstocks, designated by the producing companies as having partial or intermediate resistance to *M. incognita*. Thus, pot experiments were carried out with seven cultivars, being them cvs. Auroch, Emperador, King Kong, Maxifort, Actimino, Multifort, Silex, and with the cv. Money maker and Coração de Boi as controls, under controlled conditions, following standard evaluation methodology of the tomato host reaction to RKN. Sixty days after inoculation, the numbers of galls and egg masses and the final population were determined, being thus, the gall index, the egg mass index, the reproduction factor and the relative reproduction index were calculated. The parameters of plant height, number of leaves, shoot and root fresh and dry weights were also registered.

The numbers of galls and egg masses in tomato cv. Money maker (control) were significantly higher compared to the other rootstocks. However, the nematode reproduction factor in roots of rootstock cv. KingKong ( $12,2 \pm 2,5$ ) was comparable to that obtained in cv. Moneymaker ( $13 \pm 2,5$ ); being even higher in the rootstock cv. Maxifort ( $22.4 \pm 3,6$ ) ( $p < 0.05$ ). Plants of cultivars Coração de Boi, King kong and Moneymaker inoculated with the nematodes were significantly shorter than those non-inoculated. From the evaluation of the reproduction factor and the gall index it was concluded that with the exception of cv. Silex, all cvs. tested were susceptible to *M. incognita*, according to the standard classification. However, some of the tested cultivars had a reproduction index lower than 25% and fewer galls and egg masses than susceptible controls (Actimino,

Auroch, Emperador, Multifort and Silex,  $p < 0.05$ ), and therefore have desirable indicators of nematode host reaction. Considering the obtained results, it is important to characterize the host reaction of the commercial rootstocks of tomato, generally considered partially resistant to RKN. The terminology 'intermediate resistance' or 'partial resistance' usually used by seed companies may be interpreted as indicative of the reduction in root numbers of galls, but it does not seem to reflect the host efficiency of the plants, which could allow the population increase of RKN.

**Keywords:** sustainable control of diseases, reproduction factor, resistance, *Solanum lycopersicum*, susceptibility.



## **Agradecimentos**

Queria agradecer ao Instituto Politécnico de Viana do Castelo – Escola Superior Agrária, a todos os docentes e colaboradores que contribuíram para a realização deste estágio. Agradeço às minhas orientadoras de estágio, Doutora Sofia Costa e Professora Doutora Isabel Mourão, por me proporem para a concretização deste projeto, pela disponibilidade demonstrada, e apoio prestado no decorrer do ensaio. Reforço o especial apoio em laboratório dos colegas inseridos no mesmo projeto, Lurdes Silva e David Pires.

Relativamente à oferta das sementes para o ensaio, agradeço aos Engenheiros Sérgio Santos e Cristina Olima da empresa Monsanto com as cultivares de porta-enxerto de tomateiro Maxifort e Multifort, ao Eng<sup>o</sup> Paulo Ribeiro da Enza Zaden com a cultivar Actimino, ao Eng<sup>o</sup> Jorge Faria da Sakata da cultivar Auroch, ao Eng<sup>o</sup> Vasco Vital da Fitó da cultivar Silex e ao Eng<sup>o</sup> António Chitas da Rijk Zwaan pela cedência das cultivares Emperador e King Kong.

Aos Serviços Analíticos da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, em especial ao Eng.<sup>o</sup> Virgílio Peixoto e às suas colaboradoras, pela sua excelente ajuda na realização dos trabalhos laboratoriais.

Por fim, agradeço à minha família, em especial aos meus pais e irmã, pelo apoio e incentivo prestado no decorrer do estágio.

## **Lista de abreviaturas e símbolos**

**A1.1 a A1.10** - Anexos

**%** – Percentagem

**>** – Maior

**Cv** – Cultivar

**ESA/IPVC** – Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viana do Castelo

**P <0,05** – Significativo a 5% de probabilidade

## Lista de quadros

<b>Quadro 1.1.</b> Principais pragas da cultura do tomateiro. ....	3
<b>Quadro 1.2.</b> Principais doenças causadas por fungos e bactérias.....	5
<b>Quadro 2.1.</b> Escala de correspondência entre o número galhas e de massas de ovos de NGR e os respectivos índices (Taylor e Sasser 1978). ....	36
<b>Quadro 2.2.</b> Classificação da resistência do hospedeiro a NGR, com base no índice de reprodução relativa (RI) (Taylor e Sasser, 1978). ....	37
<b>Quadro 2.3.</b> Escala de classificação do grau de resistência (DR) do hospedeiro a NGR, com base no índice de massas de ovos (EI) (Hadioseganda e Sasser 1982). ....	37
<b>Quadro 2.4.</b> Classificação do grau de resistência (DR) da planta a NGR, com base no índice de galhas (GI) e no fator de reprodução (Rf), de acordo com as designações propostas por Sasser et al. (1984).....	38
<b>Quadro 3.1.</b> Reação hospedeira dos porta-enxertos e das cultivares de tomateiro utilizadas como testemunha positiva (realçadas a verde) segundo Sasser et al. (1984). ....	41

## Lista de figuras

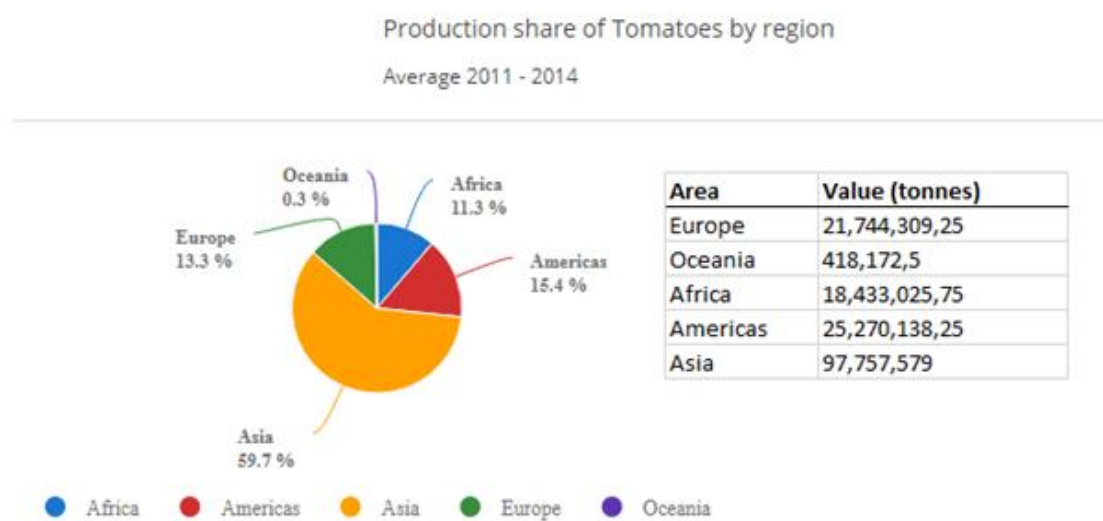
<b>Figura 1.1.</b> Distribuição mundial da produção de tomate (2011-2014) (FAO,2014).....	1
<b>Figura 1.2.</b> Produção média, entre 2011 e 2014 dos 10 países maiores produtores de tomate (FAO, 2014).....	2
<b>Figura 1.3.</b> Ciclo de vida do nemátode <i>Meloidogyne javanica</i> . (1) o J1 sofre uma muda dentro do ovo transformando-se em J2; (2) o J2 eclode do ovo; (3) o J2 move-se no solo, localiza e invade uma raiz; (4) estabelecimento do local de alimentação; (5) desenvolvimento em J3 e J4, diferenciação em machos e fêmeas adultos e formação de galhas, em resposta ao parasitismo; (6) a fêmea deposita ovos numa massa gelatinosa; (7) as massas de ovos estão visíveis na superfície da raiz; (8) os ovos são libertados no solo, completando o ciclo de vida (Adaptado de Mitkowski & Abawi, 2003). ....	11
<b>Figura 3.1.</b> Número de galhas e de massas de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> por raiz. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).....	40
<b>Figura 3.2.</b> Índice de reprodução relativa de <i>M.incognita</i> . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). ....	41
<b>Figura 3.3.</b> População final / número de massas de ovos, representativo da fecundidade das fêmeas de <i>M.incognita</i> . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).....	42
<b>Figura 3.4.</b> Alturas em cm das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).....	42
<b>Figura 3.5.</b> Número de folhas das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).....	43
<b>Figura 3.6.</b> Peso fresco da parte aérea em gramas das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).....	43
<b>Figura 3.7.</b> Peso seco da parte aérea em gramas das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).....	44
<b>Figura 3.8.</b> Peso fresco da parte radicular em gramas das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). ....	44
<b>Figura 3.9.</b> Peso seco da parte radicular em gramas das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).....	45
<b>Figura 3.10.</b> Peso seco da parte aérea / Peso seco da parte radicular das diferentes cultivares, com e sem inoculação. * indicativo das cultivares que apresentaram diferenças significativas. ....	46

# 1. Introdução

## 1.1. A cultura do tomateiro

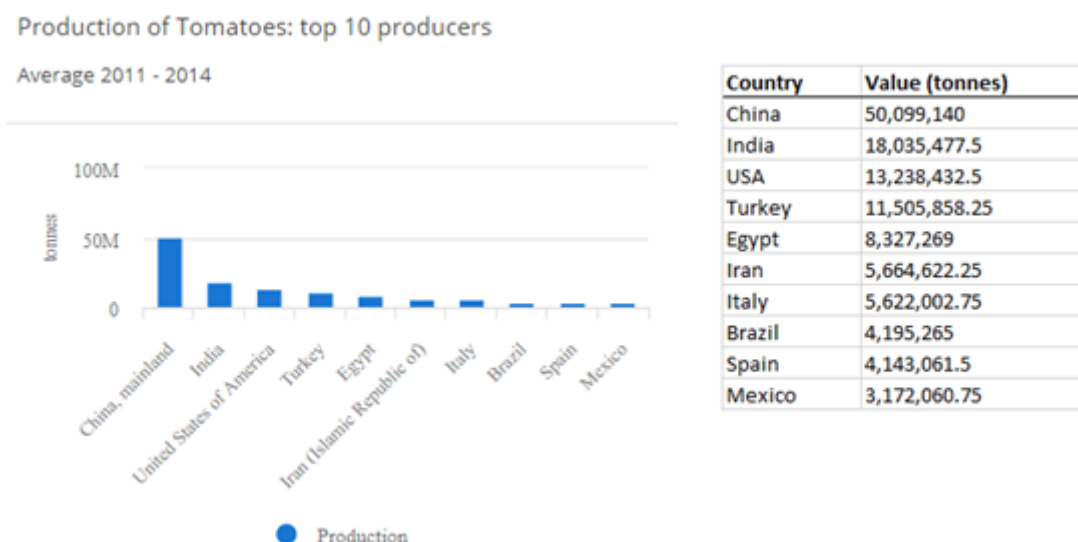
O tomateiro pertence à família *Solanaceae*, originária da região dos Andes, na zona costeira ocidental da América do Sul, entre o Equador e o Chile (Costa e Heuvelink, 2005; Almeida, 2006). No entanto, esta cultura foi domesticada no México e introduzida na Europa em 1544, supondo-se que a Itália tenha sido o primeiro país europeu onde a cultura teve expressão. Posteriormente, disseminou-se da Europa para a Ásia meridional e oriental, África e Médio Oriente (Dam et al., 2005).

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma cultura que ocupa um lugar sobremaneira importante em termos de produção e valor económico, estando em segundo lugar em volume de produção mundial, ficando abaixo apenas da batata (*Solanum tuberosum* L.). É uma das culturas olerícolas mais industrializadas (FAO, 2014) e, segundo os dados mais recentes da FAOSTAT, o continente Asiático ocupa o lugar de maior produtor mundial desta cultura (59,7 %) e a Europa apenas 13,3% (Fig.1.1).



**Figura 1.1.** Distribuição mundial da produção de tomate (2011-2014) (FAO,2014).

Segundo a mesma fonte, entre 2011 e 2014, no ranking dos 10 países com maior produção de tomate, para além da China, destacava-se a Índia, os Estados Unidos da América e a Turquia, conforme a figura 1.2.



**Figura 1.2.** Produção média, entre 2011 e 2014 dos 10 países maiores produtores de tomate (FAO, 2014).

Conforme as estatísticas agrícolas do ano 2016 do Instituto Nacional de Estatística (INE) a cultura hortícola de tomate em Portugal, entre 2014 e 2016, em termos de superfície ocupada (ha) tendencialmente aumentou no tomate para indústria, embora tenha ocorrido um ligeiro decréscimo na área de tomate para consumo em fresco de 2015 para 2016. A produção nacional da cultura teve, assim, uma quebra de 2015 para 2016, que foi de cerca de 234 mil toneladas no tomate para consumo em fresco (INE, 2017). No que concerne ao preço anual pago ao produtor por 100 kg de tomate para consumo em fresco, o preço teve um ligeiro decréscimo de 2015 para 2016, de cerca de 1,60 € (INE, 2017).

### Principais inimigos da cultura

As culturas são ameaçadas por várias pragas e doenças que influenciam negativamente a produtividade e a qualidade dos produtos. Os inimigos das culturas contribuem, assim, para a redução quantitativa e/ou qualitativa da produção, com consequências nefastas para o setor agrícola (Amaro, 2003).

O conceito de inimigo da cultura está condicionado por três fatores: a cultura, o ambiente e o tempo. Os fatores abióticos, nomeadamente, a secura ou o excesso de humidade, o vento e a radiação ultravioleta, e os fatores bióticos, como sejam, os organismos auxiliares (ex.: predador, parasitóide), influenciam significativamente o impacto de um inimigo da cultura. Por fim, o tempo é essencial para que possam ocorrer as condições ambientais

mais favoráveis e adequadas para as fases de desenvolvimento do inimigo da cultura (Amaro, 2003).

As doenças das plantas são anormalidades provocadas pela ação contínua de um agente patogénico que, ao infetar a planta ou um dos seus órgãos, altera o seu metabolismo. As doenças das plantas, incluindo o tomateiro, são causadas fundamentalmente por bactérias, fungos, nemátodes e vírus. Podem também ser provocadas por fatores abióticos, como deficiência ou excesso de nutrientes, fitotoxicidade por produtos fitofarmacêuticos e luminosidade inadequada, entre outros, também designadas por distúrbios fisiológicos ou doenças abióticas (Lopes e Reis, 2011).

Nos quadros (1.1 e 1.2) estão enumeradas as principais pragas e doenças presentes na cultura do tomateiro, referidas por Almeida (2006).

**Quadro 1.1.** Principais pragas da cultura do tomateiro.

<b>Nome vulgar</b>	<b>Espécies</b>
Ácaros	
Ácaro do bronzeado	<i>Aculops lycopersici</i>
Ácaro branco	<i>Polyphagotarsetus lanus</i>
Aranhão vermelho	<i>Tetranychus urticae</i>
Afídeos	<i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis gossypii</i> , <i>A.fabae</i> , <i>A. craccivora</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Aulocorthum solani</i>
Alfinete	<i>Agrostis</i> spp.
Cicadelas	<i>Hauptidia maroccana</i>
Escaravelho	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
Lagarta do fruto	<i>Helicoverpa armigera</i> (sin. <i>Heliothis</i> )
Lagartas das folhas	<i>Autographa gamma</i> , <i>Chrysodeixis calcites</i> , <i>Thysanoplusia orichalcea</i> , <i>Spodoptera littoralis</i>
Larvas mineiras	<i>Liriomyza</i> spp.
Melolonta	<i>Melolontha</i> spp.
Moscas brancas	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> , <i>Bemesia tabaci</i>
Ralos	<i>Crylotalpagryllot alpa</i>
Roscas	<i>Agrotis segetum</i>
Scutigerela	<i>Scutigerellaim maculata</i>
Tripes	<i>Frankliniella occidentalis</i> , <i>Thrips tabaci</i>

**Fonte:** Adaptação de Almeida (2006).

De referir que, para além das pragas citadas no quadro 1.1, de 2006, surgiu posteriormente uma outra praga, designada por traça do tomateiro com o nome científico de *Tuta absoluta*, Meyrick, 1917, pertencente à ordem Lepidoptera e à família Gelechiidae, nativa da América do Sul e considerada uma das pragas mais devastadoras do tomateiro em várias partes do mundo (Urbaneja et al., 2007; Monserrat, 2009). Esta é uma das pragas mais agressivas e recentes na cultura do tomateiro, sendo, atualmente, considerada uma praga chave desta cultura. Foi detetada na Europa, pela primeira vez, em Espanha, em 2006 e, em Portugal, foi registada a sua presença, em cultura protegida de tomateiro, no Algarve, em maio de 2009. Em tomate para indústria, foi na campanha de 2011 que ocorreram prejuízos pela primeira vez, na região do Ribatejo. O principal hospedeiro deste lepidóptero é o tomateiro, mas pode também atacar batateira e beringela, assim como solanáceas infestantes, como erva-moira (*Solanum nigrum*) e figueira-do-inferno (*Datura stramonium*). Nestes hospedeiros, a lagarta alimenta-se de diferentes órgãos da planta como folhas, frutos, botões florais, pedúnculos e caules, contudo, os estragos (galerias) encontram-se sobretudo nas folhas e frutos (Monserrat, 2009; Méndez, 2010; Freire, 2015).

A presença do nemátode-das-galhas radiculares (*Meloidogyne* spp.), como sendo um agente patogénico, favorece ou agrava os ataques de fungos do solo como *Fusarium* spp. e *Verticillium* spp. Os principais fungos que atacam a cultura encontram-se listados nos Quadros 1.2 e as doenças que mais estragos provocam na cultura do tomateiro em estufa, são o míldio, o oídio, a fusariose, a podridão cinzenta e a suberose radicular (Almeida, 2006).



**Quadro 1.2.** Principais doenças causadas por fungos e bactérias.

Nome vulgar	Espécies
Alternariose	<i>Alternaria dauci</i> f. sp. <i>Solani</i> , <i>A. solani</i> , <i>A. alternata</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> , <i>A. alternata</i>
Podridão cinzenta	<i>Botrytis cinerea</i>
Cladosporiose	<i>Cladosporium</i>
Antracnose	<i>Fulvum</i>
Podridão do pé	<i>Colletotrichum phomoides</i> , <i>C. coccodes</i>
Fusariose vascular	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>
Fusariose radicular	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Radicis- lycopersici</i>
Oídio	<i>Leveillula taurica</i>
Míldio	<i>Phytophth infestans</i>
Míldio terrestre	<i>Phytophthora parasitica</i>
Suberose radicular ou doença das raízes encortiçadas	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>
Murchidão das plântulas	<i>Pyzoctonia</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.
Rizootónia	<i>Rhizoctonia solani</i>
Podridão branca ou sclerotiniose	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Septoriose	<i>Septoria lycopersici</i>
Verticiliose	<i>Verticillium albo-atrum</i> , <i>V. dahliae</i>
Pinta negra do tomateiro	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Necrose da medula	<i>Pseudomonas corrugata</i> pv. <i>tomato</i>
Mal murcho do tomateiro	<i>Rolstonia solanacearum</i> pv. <i>tomato</i>
Podridão bacteriana do tomateiro	<i>Erwinia chrysanthemum</i> pv. <i>tomato</i>
Cancro bacteriano	<i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>tomato</i> <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> pv. <i>tomato</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>

**Fonte:** Adaptado de Almeida (2006).

## 1.2 Nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR) na cultura do tomateiro

Os danos causados pelos nemátodes fitoparasitas são uma das principais preocupações dos produtores de tomate, pois esses agentes patogénicos provocam consequências diretas e indiretas, deixando as plantas predispostas ao ataque de outros agentes patogénicos. Estes provocam anualmente prejuízos avultados, reduzindo a quantidade e a qualidade de produtos agrícolas. Na maior parte das vezes, o cultivo chega a ser abandonado em campos altamente infestados devido à difícil e dispendiosa ação de controlo deste grupo de agentes patogénicos (Nicol *et al.*, 2011).

São conhecidas mais de 26 000 espécies de organismos pertencentes ao Filo Nematoda, e uma estimativa global de mais de 1 milhão de espécies (Scheffers *et al.*, 2012; Hugot *et al.*, 2001). Estes animais existem em grande abundância e encontram-se distribuídos em todos os tipos de habitats que possuam condições de humidade e nutrientes necessários (Yeates, 1979; Boag & Yeates, 1998). Em cadeias tróficas do solo, os nemátodes estão presentes na decomposição de matéria orgânica em nutrientes minerais e orgânicos, podendo ser absorvidos pelas plantas, potenciando o crescimento da planta e a produtividade das culturas (Ingham *et al.*, 1985; Ferris *et al.*, 1998, 2004). Desta forma, estes nemátodes de vida livre, mais numerosos que os fitoparasitas, adquirem um papel de charneira e têm benefícios na mineralização de nutrientes, tornando-os disponíveis para as plantas (Bardgett *et al.*, 1999).

A alimentação dos nemátodes permite criar estabilidade na rede trófica do solo (Yeates *et al.*, 2009). Devido à sua elevada diversidade funcional e intervenção em processos fundamentais no solo, os nemátodes têm sido progressivamente utilizados como indicadores da qualidade do solo, essencialmente no que concerne nas respostas a curto prazo quando se aborda as alterações ambientais (Bongers, 1990; Ettema & Bongers, 1993; Neher & Campbell, 1994). Os nemátodes de vida livre abarcam os grupos tróficos bacterívoros, fungívoros, omnívoros e predadores (Yeates *et al.*, 1993). O nemátode mais estudado é sem dúvida, o bacterívoro *Caenorhabditis elegans* (Blaxter, 2011), um organismo-modelo da biologia, sendo o primeiro animal a ter o seu genoma completamente sequenciado (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Por oposição aos nemátodes de vida livre, outros nemátodes podem parasitar animais vertebrados e invertebrados, ou plantas. De momento encontram-se descritas mais de 4100 espécies de nemátodes fitoparasitas (Decraemer & Hunt, 2006). A maior parte deles são polípagos ou com uma vasta gama de hospedeiros, acreditando-se que para cada espécie de planta vascular haverá pelo menos uma espécie de nemátode com possibilidade de parasitá-la (Castagnone-Sereno & Danchin, 2014).

Os nemátodes fitoparasitas são microscópicos (tendo menos de 1 mm de comprimento) e poderão estar associados às raízes ou à parte aérea das plantas, podendo interagir com o seu hospedeiro de diferentes formas. Estes nemátodes têm na extremidade anterior um estilete geralmente oco e extensível, funcionando como agulha ou lança bucal, podendo penetrar a parede celular e proporcionar a alimentação, ou mesmo a entrada do próprio nemátode na raiz. Todos os nemátodes fitoparasitas são parasitas obrigatórios, ou seja,

não conseguem completar o seu ciclo de vida se não se alimentarem das plantas (Nicol *et al.*, 2011).

Os danos causados por nemátodes fitoparasitas têm provocado gastos anuais económicos avultados, mas a probabilidade do impacto económico ser ainda maior é uma realidade, dado que os países em desenvolvimento desconhecem muitas vezes a presença destes agentes patogénicos no solo (Nicol *et al.*, 2011).

A classificação dos nemátodes fitoparasitas varia de acordo com a forma e o local de alimentação. Assim, estes podem classificar-se como ectoparasitas ou endoparasitas, e dentro desta classificação, sedentários ou migratórios (Jones & Jones, 1964). Os nemátodes ectoparasitas mantêm-se fora da planta e alimentam-se habitualmente nos pêlos radiculares ou no tecido cortical da superfície externa da raiz. Na maior parte das situações, encontram-se em grande número, mas nem sempre acarretam problemas, no entanto, podem causar sérios estragos se a planta estiver sujeita a outros stresses bióticos ou abióticos (Yeates *et al.*, 1993; Coyne *et al.*, 2007). No que se refere aos endoparasitas, estes podem ser migratórios ou sedentários, passando grande parte do seu ciclo de vida dentro de bolbos, raízes ou tubérculos e, assim, podem ser facilmente disseminados pelo Homem (Nicol *et al.*, 2011). Com a exceção do ovo, os nemátodes endoparasitas migratórios mantêm a mobilidade em todos os estádios, movendo-se dentro da raiz, de célula para célula, ou deixando o tecido vegetal para procurar novos locais de alimentação (Jones & Jones, 1964). Estes entram no hospedeiro e deslocam-se nos tecidos radiculares, provocando lesões radiculares e danos generalizados (Nicol *et al.*, 2011). No entanto, os nemátodes fitoparasitas que causam mais prejuízos económicos são espécies de nemátodes endoparasitas sedentários, que vivem parte do seu ciclo de vida no interior da raiz, mantendo-se fixos a um local, como os NGR e os nemátodes-de-quisto (Goeldi, 1892; Chitwood & Chitwood, 1937; Chitwood, 1949; Stone, 1973). Nos nemátodes endoparasitas sedentários, são os jovens do segundo estágio o estágio vermiforme infetivo que invade os tecidos vegetais (Jones & Jones, 1964).

Os NGR são endoparasitas obrigatórios com uma vasta distribuição geográfica e uma ampla gama de hospedeiros, parasitando plantas que proporcionem o seu desenvolvimento e reprodução (Trudgill, 1997; Trudgill *et al.*, 2000; Karssen, 2002).

Segundo os nematologistas, o género *Meloidogyne* foi considerado desde sempre o mais prejudicial (Jones *et al.*, 2013) sendo conhecidas atualmente 98 espécies, que parasitam mais de 5500 espécies de plantas, isto é, a maioria das plantas superiores (Goodey *et al.*,

1965; Castagnone-Sereno & Danchin, 2014), tendo recentemente sido classificados como número um na lista dos 10 nemátodes fitoparasitas mais importantes (Jones *et al.*, 2013). No seu conjunto, as espécies deste género combinam a capacidade de parasitar todas as plantas vasculares com uma distribuição mundial, com maior expressão nas regiões tropicais, onde a conjugação de constante humidade e elevada temperatura potencia a sua multiplicação (Trudgill & Blok, 2001). As espécies de NGR com mais sucesso reproduzem-se por partenogénese mitótica, isto é, as fêmeas produzem clones de si próprias, o que em condições favoráveis proporciona um aumento exponencial da população para níveis prejudiciais à produção (Trudgill & Blok, 2001). A partenogénese mitótica não está dependente, como na reprodução sexuada, de um emparelhamento perfeito de cromossomas, pelo que se supõe que terá levado estas espécies a reunirem várias cópias do seu genoma, cada uma sofrendo mutações isoladamente. Isto é provavelmente o mecanismo pelo qual os NGR mantêm uma grande plasticidade genética, o que lhes permite adaptarem-se a várias condições ambientais, parasitarem uma vasta gama de hospedeiros, e ainda quebrarem a resistência da planta hospedeira ao seu ataque (Castagnone-Sereno & Danchin, 2014).

Sasser et al. (1984) referiram que a pesquisa mundial liderada pelo International *Meloidogyne* Project (IMP) demonstrou que cerca de 95% das espécies de nemátodes parasitas de raízes, que causam danos às plantas cultivadas, pertencem a este género.

A severidade do ataque dos nemátodes depende muito da suscetibilidade da cultivar plantada, da espécie e do género de nemátodes presente nos solos, do nível populacional do nemátode na área e do tipo de solo cultivado. De uma forma geral, terrenos arenosos ou franco-arenosos são mais favoráveis, por facilitarem a movimentação e migração dos nemátodes. Cultivos sistemáticos de culturas hospedeiras, podem também favorecer a multiplicação dos nemátodes, proporcionando um ataque mais severo (Gundy, 1985).

As plantas de tomateiro, quando são atacadas de uma forma severa por *Meloidogyne* sp., apresentam aspeto clorótico, uma diminuição no crescimento, um sistema radicular desorganizado e com poucas raízes e grande presença de galhas radiculares, o que interfere com a absorção de água e nutrientes, reduzindo assim o número e qualidade dos frutos. Quando a infeção acontece no estágio de plântula, estas podem morrer no transplante para o solo e as plantas que sobrevivem têm a frutificação fortemente afetada em quantidade e qualidade (Vale et al., 2013). As densidades populacionais de NGR estão diretamente relacionadas com a infeção da planta. Esta afeta a absorção de água e

nutrientes pelas raízes e diminui a taxa de fotossíntese nas folhas. Com esta infeção os fotoassimilados são mobilizados dos rebentos para as raízes, mais concretamente para as células gigantes induzidas pelos nemátodes, de forma a sustentar o desenvolvimento e reprodução destes (Hussey, 1985; Carneiro *et al.*, 1999). Salienta-se ainda que uma infeção por NGR conduz à diminuição drástica da produtividade das plantas e os sintomas não-específicos são provocados por uma alteração do metabolismo, acarretando uma debilidade dos sistemas radiculares e deficiências nutricionais nas folhas, causando clorose com murchidão temporária em períodos de stresse hídrico e temperaturas elevadas. Áreas com cultivos sucessivos de tomateiro podem potenciar um aumento da população dos nemátodes presentes e também aumentar a resistência desses nemátodes a diferentes métodos de controlo.

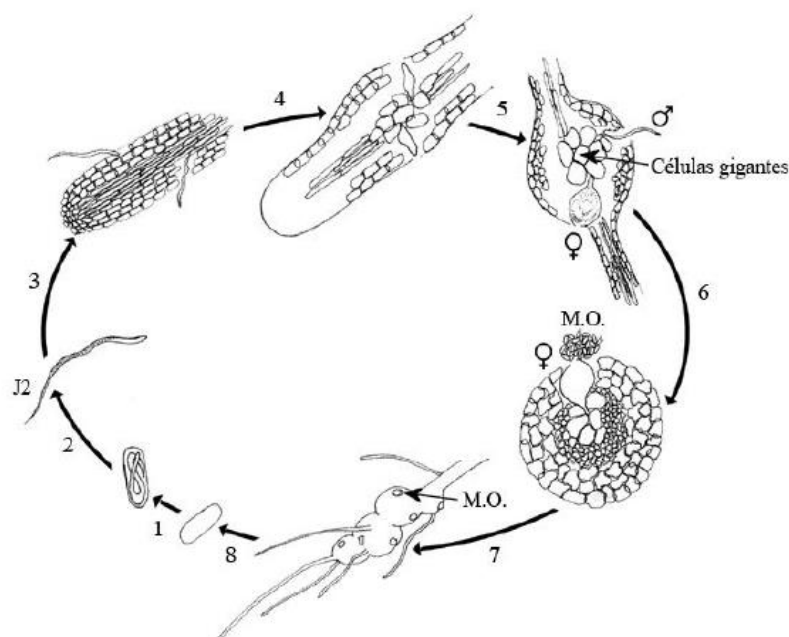
Os danos causados por NGR são muitas vezes menosprezados pelo fato de serem reconhecidos tardiamente, pois podem ser atribuídos a outras causas (Vale *et al.*, 2013). Alguns dos sintomas citados variam de acordo com a espécie e cultivar da planta e podem suscitar dúvidas com os danos associados à carência de nutrientes ou lesões causadas por bactérias, fungos ou vírus patogénicos (Hussey, 1985; Whitehead, 1997). De facto, os sintomas na parte aérea da planta são habitualmente de difícil distinção; as galhas radiculares tipicamente induzidas por NGR podem ser muito pequenas, sendo difíceis de visualizar (Wesemael *et al.*, 2011). Ao infetar a raiz, estes nemátodes instalam-se num local do cilindro central, introduzindo secreções em células do parênquima provocando a sua hipertrofia, com multiplicação nuclear e hiperplasia das células, proporcionando a formação de células gigantes e, por consequência, as típicas galhas radiculares (Sasser & Carter, 1985). As espécies com maior importância económica, usualmente referidas como as quatro espécies principais (Chitwood, 1949), são as espécies tropicais *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica*, e a espécie de climas temperados *M. hapla* (Jones *et al.*, 2013).

Dentro das espécies deste género considera-se que *M. incognita* é uma das espécies mais disseminadas do género pelo mundo. Campos (2000) refere que em 97% dos hospedeiros parasitados por *Meloidogyne* spp. encontram-se as espécies *M. incognita* e *M. javanica*, parasitando plantas infestantes, espécies florestais, árvores de fruto, culturas anuais, perenes e diversas culturas olerícolas.

Os sintomas diretos e indiretos provocados por *M. incognita* são nomeadamente, a formação de galhas, a redução no volume do sistema radicular, o descolamento cortical, a configuração de raízes digitadas, aparecimento de rachaduras em tubérculos, o aparecimento de deficiências minerais, plantas com aspeto murcho, o desfolhamento e a redução da produtividade. O sintoma mais comum da presença dessa espécie é o da formação de galhas, no entanto esse sintoma também pode ser causado por outros nemátodes (*Nacobbus*, *Xiphinema*), por insetos, por bactérias (*Agrobacterium*) e por outros organismos, porém, com mecanismos diferentes do usado por *M. incognita* (Kofoed & White, 1919; Chitwood, 1949).

No decorrer do ciclo de vida dos NGR (Fig. 1.3), o primeiro estágio juvenil (J1), que é formado após a embriogénese, passa por uma muda ainda dentro do ovo e é transformado num jovem de segundo estágio (J2), sendo visível ao microscópio, ainda dentro do ovo. Depois da eclosão, o J2 denomina-se de estágio infetivo, com mobilidade e resistência a condições adversas, que se desloca no solo até encontrar a raiz de uma planta hospedeira (Bird & Opperman, 1998). Estes J2 procuram a sua fonte de alimento através da deteção de fitoquímicos libertados pelas raízes. A sua atividade no solo depende da humidade; vivem, migram e invadem raízes, tornando-se metabolicamente inativos quando o solo está seco. Após invadir a raiz e instalar-se no local de alimentação, o J2 passa por três novas mudas até alcançar o estágio adulto. O J2 é sexualmente indiferenciado podendo transformar-se num macho ou numa fêmea. Em plantas sob stresse, com elevada temperatura ou quando a disponibilidade de alimento é insuficiente, é habitual os J2 desenvolverem-se em machos que, como não se alimentam, exercem menor pressão sobre a planta (Triantaphyllou & Hirschmann, 1959; Triantaphyllou, 1973; Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Os adultos mostram um dimorfismo sexual evidente. Os machos são vermiformes e têm mobilidade. Logo a seguir à quarta muda, abandonam a raiz e deslocam-se livremente no solo. As fêmeas, saciformes e sedentárias, alimentam-se a partir da quarta muda e subsequentemente até ao fim da vida. Estas são esbranquiçadas, brilhantes e globosas. As espécies de *Meloidogyne* reproduzem-se por fecundação cruzada ou por partenogénese obrigatória ou facultativa (Sasser & Carter, 1985; Ferraz *et al.*, 2001; Castagnone-Sereno & Danchin, 2014). Cada uma pode depositar inúmeros ovos numa massa gelatinosa, denominando-se este conjunto por massa de ovos. As massas de ovos ficam normalmente expostas no exterior da raiz (Fig. 1.3).



**Figura 1.3.** Ciclo de vida do nemátode *Meloidogyne javanica*. (1) o J1 sofre uma muda dentro do ovo transformando-se em J2; (2) o J2 eclode do ovo; (3) o J2 move-se no solo, localiza e invade uma raiz; (4) estabelecimento do local de alimentação; (5) desenvolvimento em J3 e J4, diferenciação em machos e fêmeas adultos e formação de galhas, em resposta ao parasitismo; (6) a fêmea deposita ovos numa massa gelatinosa; (7) as massas de ovos estão visíveis na superfície da raiz; (8) os ovos são libertados no solo, completando o ciclo de vida (Adaptado de Mitkowski & Abawi, 2003).

### 1.2.1. Proteção de culturas contra o ataque de NGR

Os NGR reduzem o desempenho das plantas e causam o seu declínio, que em sistemas agrícolas quer em sistemas naturais ou de baixa intervenção humana, sendo apontados como tendo um papel importante na sua distribuição (Wardle *et al.*, 2004). Assim, é de realçar que um maior conhecimento da ecologia destes nemátodes poderá vir a oferecer soluções para a sua gestão.

O mais eficiente método de eliminação dos nemátodes fitoparasitas em sistemas agrícolas consistia na aplicação de brometo de metilo. Este funcionava como biocida devido à sua elevada toxicidade, matando indistintamente os organismos edáficos, tanto prejudiciais como benéficos. Devido aos perigos provocados pela sua aplicação e efeitos nefastos sobre a camada de ozono, este foi banido no espaço da União Europeia no início do séc. XXI, o que impulsionou a investigação sobre meios alternativos de controlo de nemátodes fitoparasitas. Apesar de serem aplicados mais recentemente outros nematodocidas químicos, estes têm ainda elevada toxicidade e prevê-se que seja proibida a sua aplicação

num futuro próximo (Nicol *et al.*, 2011). Pelo exposto, tem havido um maior investimento de investigadores, estações de melhoramento de plantas e produtores na procura de alternativas mais sustentáveis para o controlo de nemátodes fitoparasitas, incitando a cooperação dos vários grupos para apresentarem soluções exequíveis para o problema.

As técnicas de controlo mais recomendadas para os nemátodes fitoparasitas, de um modo geral, são o uso de cultivares resistentes, controlo biológico, incorporação de matéria orgânica, o uso de plantas antagonistas, rotação de culturas com plantas não hospedeiras e a aplicação de nematodocidas sistémicos (Barros *et al.*, 2000). Atualmente, as estratégias de controlo de nemátodes fitoparasitas prioritárias são aquelas que diminuem custos, aumentam a produção e são sustentáveis do ponto de vista ambiental.

O facto de o tomate ser uma cultura muito consumida em fresco, principalmente em saladas, dá relevo à preocupação com a saúde dos consumidores, devido à possibilidade de resíduos tóxicos, que tem causado um aumento na procura por um tomate produzido com reduzidas aplicações de produtos químicos (Luz *et al.*, 2007).

É indubitável a preocupação crescente com o meio ambiente, observando-se o aumento da agricultura biológica, visando diminuir os efeitos adversos do uso de produtos químicos no ecossistema, por meio de métodos alternativos de controlo de pragas e doenças, a preservação das propriedades do solo, o controlo de infestantes, adubação verde e a rotação de culturas, entre outros. A perspetiva da produção biológica de hortícolas é conseguir níveis de produtividade e apresentação do produto compatíveis com as necessidades da população atual e o nível de exigência dos consumidores (Souza *et al.*, 1995).

Entre as culturas afetadas pelos NGR, o tomateiro, *Solanum lycopersicum*, é considerado um ‘hospedeiro universal’, podendo ocorrer uma quebra de produção até 100%, em condições de cultura protegida de tomate para consumo em fresco. Não estando disponíveis alternativas com a eficiência dos nematodocidas químicos, os problemas com NGR têm vindo a aumentar na Europa. Entre os meios sustentáveis de proteção de culturas hortícolas, a utilização de porta-enxertos tolerantes/resistentes é uma prática promissora para o controlo de algumas doenças de origem edáfica e tem-se vulgarizado na cultura protegida de tomateiro nos últimos anos.



## Controlo químico

O controlo químico é uma das alternativas mais utilizadas tendo em vista a redução da população dos nemátodes. A escolha dos nematodocidas depende da cultura em questão, da espécie de nemátodes a combater, condições edafo-climáticas e propriedades dos nematodocidas. Estes podem-se classificar em nematodocidas fumigantes e não fumigantes. Os nematodocidas fumigantes do solo são voláteis formando-se um gás que, rapidamente circula através dos espaços de ar contínuos no solo, atuando sobre os organismos nocivos. Dentro destes estão os pertencentes aos seguintes grupos químicos, os hidrocarbonetos halogenados e os precursores do isotiociano de metilo. Os nematodocidas não fumigantes não são voláteis e nestes incluem-se os que contêm na sua composição os seguintes grupos químicos, os organofosforados, os carbamatos, entre outros (Dgav,2016). Embora eficientes, os nematodocidas não fumigantes apresentam desvantagens por serem altamente tóxicos e acumulam-se como resíduos, nos tubérculos, raízes ou frutos comerciais (Charchar, 1995).

Relativamente à cultura do tomateiro, foi observado um maior desenvolvimento quando foram tratadas com nematodocidas. (Qiao et al.,2012), esses produtos quando aplicados no campo reduzem a população de nemátodes fitoparasitas e aumentam a produção das culturas. Muitos deles são sistémicos, isto é, são absorvidos pelo sistema radicular, circulando então na seiva da planta. O nemátode quando se alimenta dessas raízes, intoxica-se levando à sua morte (Campos et al., 2002). Existe ainda no mercado nematodocidas fumigantes ou granulares que estão em uso. Muitos destes atuam nos nemátodes do solo por contato com o nemátode. A maior parte tem efeito sobre o sistema nervoso, inibindo a enzima acetilcolinesterase (Dgav,2016). A exemplo de um produto com idêntico modo de ação existe a substância ativa homologada para o tomateiro oxamil (Vydate ® 10G, Sapec), pertencente ao grupo químico dos carbamatos.

A introdução de toxinas sintetizadas por microrganismos ou extratos de plantas e outras substâncias naturais no meio são também formas de controlo químico. Em contrapartida, o controlo químico com a aplicação de nematodocidas de síntese é o mais eficaz mas é pernicioso para organismos não-alvo e um foco de poluição para o meio ambiente, assim o seu uso está paulatinamente a ser restringido (Noling, 1995; Barker & Koenning, 1998; Piskiewicz *et al.*, 2008; Silva, 2012). Na União Europeia, o Regulamento N.º 2037/2000 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Junho de 2000, relativo às substâncias que empobrecem a camada de ozono, tem limitado gradualmente a produção,

comercialização e aplicação de brometo de metilo, que já foi usado como nematodocida (Zasada *et al.*, 2010) e que se encontra agora banido na Europa. Desta forma, a implementação desta nova legislação tem motivado a procura de meios alternativos de controlo de nemátodes fitoparasitas. Assim, têm sido colocadas em consideração outras alternativas mais seguras para o ambiente e de fácil gestão, nomeadamente, o uso de cultivares resistentes e a enxertia de hortícolas (Amin & Mona, 2014; Mourão & Brito, 2014; Costa, 2015).

Segundo (Mashela *et al.*, 2008), a aplicação de aldicarbe e fenamifos em áreas de plantação de tomateiro infestadas com NGR reduziu o número destes em cerca de 80%. Essas aplicações também aumentaram a produtividade, peso da parte aérea, altura da planta e diâmetro do caule. Franzener, 2005 observou uma redução de 89,6%, 88,4% e 94,4% no número de galhas, J2 e ovos, respetivamente, em plantas tratadas com nematodocidas em relação à testemunha não tratada e como consequência uma redução no fator de reprodução dos nemátodes.

Araújo & Marchesi (2009) relataram que aplicações de carbofurano reduziram o número de juvenis de *Meloidogyne* e aumentaram o peso da parte aérea das plantas de tomateiro. Contudo, quando comparado com o tratamento com uma rizobactéria e com o tratamento testemunha o carbofurano não conseguiu reduzir o número de massas de ovos, promover aumento da altura das plantas, assim como também não diferiu no peso de raiz.

O controlo através de nematodocidas apresenta vários inconvenientes, pois esses produtos são dispendiosos, altamente tóxicos, persistentes, têm amplo espectro de ação e podem contaminar lençóis freáticos, representando, assim, um grande risco a outros organismos e ao ambiente em geral (Franzener, 2005). Em Portugal, atualmente estão homologados para o tomateiro os nematodocidas com as seguintes substâncias ativas, sendo elas, *Bacillus firmus* I-1582, fenamifos, fluopirame e a substância ativa referida anteriormente oxamil (Dgav, 2017).

## Controlo biológico

Os nemátodes fitoparasitas têm uma vasta gama de inimigos naturais, como sejam, os fungos, ácaros, bactérias, nemátodes predadores, entre outros. Destaca-se dentro destes, os fungos como agentes potenciais para o controlo biológico. Cerca de 75% dos antagonistas já identificados são fungos encontrados normalmente nos solos e inofensivos às culturas. Já anteriormente Kerry e Crump nos anos 80 descobriram solos supressivos por causa da ação de fungos (Kerry, B; Crump, D & Mullen, 1982).

A utilização de produtos à base de microrganismos tem vindo a aumentar progressivamente. No entanto, esta é ainda uma alternativa pouco estudada e pouco utilizada na prática. O controlo biológico dos nemátodes apresenta imensas vantagens em relação ao controlo químico pois não causa danos ao ambiente, não deixa resíduos nos produtos, não favorece o surgimento de formas resistentes dos nemátodes, não causa desequilíbrio na diversidade funcional da biota do solo, com consequente reaparecimento do problema com maior severidade, pode potencialmente transformar um solo conducente em supressivo e por fim, é de fácil aplicação (Soares, 2006).

É sabido que as rizobactérias, microorganismos presentes na rizosfera, têm proporcionado defesa contra o ataque de agentes patogénicos de solo em plantas. Muitos microrganismos desse grupo são capazes de promover proteção substancial contra ataques de nemátodes (Weller, 1988).

Os rizóbios são considerados organismos radiculares mutualistas, bactérias que se associam a plantas leguminosas, induzindo a formação de nódulos nas raízes. Nos nódulos, as bactérias fixam azoto atmosférico, fornecendo este nutriente limitante à planta. Os rizóbios têm assim um papel preponderante na nutrição das plantas, e também poderão ter uma função importante na indução de defesas na planta contra NGR (Costa *et al.*, 2008). Desta forma, pensa-se que os mecanismos que os NGR utilizam para comunicar com a planta, possibilitando a infeção das raízes e a indução das galhas são idênticas aos utilizados pelos rizóbios. As estruturas radiculares de galhas formadas por NGR e de nódulos formados por rizóbios têm parecenças fisiológicas (Mathesius, 2003). Recentemente uma análise do genoma de NGR permitiu a deteção de vários genes de origem bacteriana que terão sido adquiridos horizontalmente de rizóbios (Scholl *et al.*, 2003). Os rizóbios poderão ter possivelmente um papel como indutores de resistência a

NGR em plantas leguminosas é um dos fatores apontados para o sucesso colonizador de plantas invasoras (Costa & Freitas, 2011).

As bactérias do género *Bacillus* destacam-se dentro dos microrganismos antagonistas mais estudados, as quais são eficazes na prevenção e controlo de doenças causadas por várias espécies de agentes patogénicos. Espécies de *Bacillus*, incluindo *B. thuringiensis*, *B. subtilis* e *B. cereus* destacam-se como importantes agentes de controlo biológico de agentes patogénicos presentes no solo (Emmert & Handelsman, 1999). Sharma & Gomes (1996) relataram que *B. subtilis* produziram endotoxinas que interferiram no ciclo reprodutivo dos nemátodes, essencialmente na fase da postura dos ovos e eclosão dos juvenis. Muitas espécies de *Bacillus* libertam enzimas, antibióticos, peptídicos e outras moléculas menores, como os compostos voláteis (Pérez-García et al., 2011). Existe no mercado um produto denominado BioNem WP® à base de *Bacillus firmus* que apresentou segundo Terefe *et al.*, 2009 a potencialidade para a redução de ovos e inibição da mobilidade de J2 em *meloidogyne incognita*.

As espécies de *Bacillus* são conhecidas por proporcionarem o crescimento de plantas, chamadas de PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas). Essas rizobactérias são importantes, pois, além de promoverem o crescimento das plantas, auxiliam no controlo de agentes patogénicos e não são fitotóxicas (Sikora, 1988).

Ainda dentro das bactérias como agentes de controlo biológico de NGR, análises recentes de filogenética classificaram a bactéria *Pasteuria penetrans* como sendo um ancestral das bactérias do grupo *Bacillus* spp, tanto saprófitas (*B. subtilis* e *B. halodurans*) como patogénicas (*B. cereus* e *B. anthracis*) (Charles et al., 2005 in Costa *et al.*, 2006).

É também sabido que cada espécie de *Pasteuria* spp. é específica para um género de nemátodes (Chen & Dickson, 1998). No entanto, *Pasteuria penetrans* é um conhecido parasita obrigatório do nemátode-das- galhas radiculares (*Meloidogyne* spp.), que previne a produção de ovos e impede a penetração J2 nas raízes (Williams *et al.*, 1989), sendo assim, um potencial agente de controlo biológico dos NGR (Stirling, 1991).

Sob condições naturais, a bactéria só pode completar seu ciclo de vida dentro de um nemátode hospedeiro. Jovens de segundo estágio de *Meloidogyne* spp. adquirem os endósporos adesivos de *P. penetrans* à medida que migram através do solo em busca de um hospedeiro vegetal. Depois de um J2 carregado de esporos estabelecer um local de

alimentação permanente dentro do sistema vascular de uma raiz, a bactéria produz um tubo de germinação que penetra na cutícula dos nemátodes e depois cresce vegetativamente dentro do corpo do nemátode. O nemátode infetado não é morto e continua a desenvolver-se até à fase adulta. Os endósporos são produzidos dentro do corpo das fêmeas e são libertados no solo quando a cutícula do nemátode é rompida. Além de esterilizar fêmeas, *P. penetrans* pode reduzir desta forma, a infeção de raízes por nemátodes quando os J2 tornam-se fortemente envoltos por esporos da bactéria e a movimentação dos nemátodes fica restrita. (Davies et al., 1991; Stirling, 1984 in Timper et al, 2015).

Os fungos nematófagos também têm sido amplamente estudados para a utilização no controlo dos nemátodes. Algumas espécies como *Trichoderma longibrachiatum*, *Purpureocillium lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* têm sido eficazes no controlo biológico de espécies de *Meloidogyne*. (Howell, 2003).

Espécies do género *Trichoderma* estão presentes em todo o mundo e são facilmente isoladas do solo, madeira em decomposição e outras formas de matéria orgânica. Possuem taxa de crescimento rápido e produzem numerosos conídios de coloração verde. Fungos desse género são caracterizados por parasitarem ovos e juvenis através da produção de enzimas, promoverem antibiose, competição, promoção de crescimento e também são capazes de induzir os mecanismos de defesas das plantas (Howell, 2003).

Assim como *Trichoderma* a espécie *Purpureocillium lilacinum*, anteriormente conhecida como *Paecilomyces lilacinus*, é um fungo de solo, saprófita capaz de utilizar grande parte de substrato e é adaptado a uma ampla faixa de pH. É um fungo parasita de ovos e cistos, com pouca especificidade de hospedeiros (Goettel et al., 2001).

Kiewnick & Sikora (2006) registaram uma redução de 66%, 74% e 71% no número de galhas, número de ovos e na população final de nemátodes nas raízes de tomateiro, respectivamente, com tratamento com *P. lilacinum* em solo infestado com *M. incognita*. Cabanillas & Barker, 1989 também relatou que *P. lilacinum* reduziu significativamente a população de *M. incognita* das raízes de tomateiro e Lara et al. (1996) observaram ainda um aumento na produtividade da cultura.

O fungo *Pochonia chlamydosporia*, conhecido previamente como *Verticillium chlamydosporium*, é outro fungo que também se destaca no controlo biológico de nemátodes. Este é um fungo parasita facultativo de ovos e fêmeas de NGR e cistos,

vastamente distribuído pelo mundo (Kerry et al., 1982). Tem a potencialidade de sobreviver na ausência do hospedeiro, pois produz clamidósporos, tornando-o mais resistente a condições adversas do ambiente, este apresenta boa capacidade saprofítica e é fácil de cultivar *in vitro* (Freire & Bridge, 1985).

A fase mais vulnerável ao ataque de agentes patogénicos é a fase de ovo do ciclo de *Meloidogyne*, pois estão habitualmente localizados sob a superfície das raízes, agrupados numa matriz gelatinosa, esses ovos ficam expostos ao parasitismo de antagonistas como *P. chlamydosporia* que se podem fixar nas proximidades das raízes e eliminar grandes quantidades de ovos (Stirling, 1991).

Os solos cujas as populações do nemátodes se conservam naturalmente em baixos níveis populacionais, ou também designados de solos supressivos, mesmo na presença da planta hospedeira, foram inicialmente descritos nos anos 80 pelo Prof. Brian Kerry e o Dr. David Crump, da estação de investigação agrária Rothamsted Research, Reino Unido. Dos campos analisados, isolou-se uma grande variedade de microrganismos inimigos naturais de nemátodes, destacando-se o fungo supracitado *Pochonia chlamydosporia* (Kerry et al., 1982). A utilização eficaz deste fungo como agente de controlo biológico de nemátodes fitoparasitas está de certa forma comprometido devido a determinados fatores tais como,:

- i) a transição da fase parasita de nemátodes para a fase meramente saprófita, especialmente em solos ricos em matéria orgânica; ii) a comum dificuldade de estabelecer o fungo na rizosfera através da inoculação de esporos no campo; iii) o reduzido contacto entre o fungo e os ovos dos NGR observado em plantas muito suscetíveis a NGR, em que a maioria das massas de ovos produzidas se encontram no interior de volumosas galhas na raiz, não ficando expostas à superfície (Bourne *al.*, 1996).

O controlo biológico pode assim, incluir a introdução de agentes microbianos, como bactérias e fungos. Contudo, esta estratégia de controlo é extremamente difícil no solo, por se tratar de um ambiente complexo e, se muitas vezes tem sucesso, outras não alcança resultados satisfatórios, sendo difícil avaliar a causa do insucesso (Kerry & Hominick, 2002).

Em ecossistemas agrícolas em modo de produção biológico são habitualmente observados uma biodiversidade e atividade biológica mais elevadas e um teor de matéria orgânica do solo superior (FiBL, 2000), que poderão desencadear o desenvolvimento de solos supressivos contra nemátodes fitoparasitas (Widmer *et al.* 2002). Indubitavelmente, as práticas de consociação e de rotação de culturas, tal como a fertilização orgânica nestes

agroecossistemas poderão contribuir para a manutenção de vários mecanismos de controlo de nemátodes fitoparasitas, que já foram descritos em ecossistemas de baixa intervenção humana. O facto de não se utilizar pesticidas de síntese com largo espectro de ação poderá manter as populações benéficas de organismos do solo que, de acordo com os estudos feitos em sistemas naturais, poderão ter uma ação determinante no controlo de nemátodes fitoparasitas. Estes organismos abarcam não só os fungos e bactérias mutualistas das plantas (micorrizas, rizóbios), como os inimigos naturais dos nemátodes responsáveis pelo seu controlo, e também os nemátodes de vida livre, que afetam as populações dos nemátodes fitoparasitas indiretamente (Costa, 2014).

Tendo em consideração que os NGR adquiriram genes que lhes possibilita comunicarem com a planta a partir de rizóbios (Scholl *et al.*, 2003) e que estas bactérias poderão induzir na planta resistências a nemátodes (Costa & Freitas, 2011), a interação rizóbio-nemátode-planta poderá ser também potencialmente explorada para o controlo dos NGR. Desta forma, será desejável que a adubação verde, geralmente obtida através do cultivo e incorporação no solo de plantas leguminosas possa indiretamente reduzir as populações de NGR (Costa, 2014).

### **Controlo cultural**

Para evitar o aumento da população dos agentes patogénicos pode-se recorrer a práticas culturais que visam a diminuição do stress das plantas, como seja uma adequada adubação, rotação de culturas, pousio com eliminação total das plantas infetadas e de plantas infestantes, favorecendo assim, o controlo integrado de pragas e doenças. Idealmente, o pousio de campos cultivados levaria à morte dos nemátodes fitoparasitas presentes, uma vez que estes não conseguiriam sobreviver sem alimento. No entanto, a polifagia dos NGR permite-lhes manter as suas populações alimentando-se de outras plantas, incluindo plantas espontâneas (Castagnone-Sereno & Danchin, 2014).

Práticas de adubação azotadas, ricas em fósforo e potássio têm mostrado também respostas positivas na redução das populações de *Meloidogyne*, com menor número de galhas, bem como aumento no crescimento da planta (Ritzinger & Fancelli, 2006). É sobremaneira conhecido que plantas nutricionalmente equilibradas conseguem tolerar mais a ação dos nemátodes fitoparasitas. Alguns fertilizantes promovem a melhoria das condições de proteção física das culturas a partir do equilíbrio dos nutrientes. As

deficiências em potássio e cálcio provocam mudanças estruturais e bioquímicas, alterando as barreiras mecânicas e a síntese de toxinas, tornando as plantas mais suscetíveis ao ataque de agentes patogênicos (Graham & Webb, 1991).

A cultura do tomateiro necessita de grandes quantidades de nutrientes, apresentando exigências nutricionais diferenciadas com os estádios de desenvolvimento, com o ciclo de cultivo (curto, médio e longo), com o genótipo e com a época do ano (Silva & Giordano, 2000). Havendo um desequilíbrio nutricional, o vigor e as reações de defesa da planta podem ser influenciadas, reduzindo a resistência do hospedeiro (Bedendo, 2011). A aplicação de fertilizantes pode afetar diretamente os diferentes gêneros de nemátodes, interferindo com o seu desenvolvimento (Boneti et al., 1982).

Na maior parte das vezes, os fertilizantes são adicionados em solos naturalmente infestados com nemátodes fitoparasitas com o objetivo de nutrir a planta hospedeira e compensar, de certa forma, a ação parasítica dos nemátodes, os quais, geralmente, tendem a agravar os sintomas de carências nutricionais (Boneti et al., 1982). Assim, a fertilização e a nutrição podem também aumentar a resistência da planta, dificultando a penetração e o desenvolvimento dos nemátodes (Zambolim et al., 2005).

Existem várias ações, que podem ser adotadas para a redução das populações de espécies de nemátodes. A inundação de campos é uma das ações utilizadas por períodos extensos bem como o recurso à pasteurização, vaporização ou solarização, em que o solo atinge temperaturas letais para os nemátodes. A solarização é a prática mais eficaz e consiste em cobrir o solo com um plástico transparente. A radiação solar incidente no solo é refletida pelo plástico, levando ao aquecimento do solo e criando condições hostis para a maioria dos seres vivos sensíveis à temperatura. No entanto, a presença de nuvens e a chuva limitam a radiação solar e podem diminuir o sucesso da solarização (Katan, 1980; DeVay, 1991).

A lavoura é outra técnica usada, que permite misturar o solo, expondo as camadas do solo mais profundas ao sol e tendo como fim eliminar os nemátodes por desidratação, pois estes dependem da humidade para sobreviver. No entanto, esta prática pode eliminar alguns dos nemátodes que se encontram nas camadas superficiais do solo, mas não é contudo uma solução eficaz, dado que os nemátodes podem penetrar para camadas mais profundas do solo no sentido de evitar a desidratação tornando-se assim inativos, o que lhes permite sobreviver nestas condições. Além disso é uma prática generalista, que mata



também os nemátodes de vida livre, sendo estes últimos efetivamente benéficos, ajudando na remineralização de nutrientes (Krueger & McSorley, 2008).

No entanto, essas práticas, muitas vezes, são difíceis de serem aplicadas, dependendo da disponibilidade de água e do tipo de solo. Uma outra forma que se tem mostrado eficiente na supressão de pragas e doenças, é a utilização da rotação de culturas, que quebra o ciclo desses organismos por um determinado tempo, no entanto, para a realização dessa prática cultural deve-se ter conhecimento do ciclo biológico e o tempo que o hospedeiro permanece nas espécies a serem implantadas na rotação e também ter conhecimento das espécies de nemátodes presentes na área em causa (Ritzinger & Fancelli, 2006).

### **Controlo genético**

Atualmente, uma das alternativas de controlo de nemátodes mais desejada é a utilização de plantas resistentes, pois pode ser compatível com outras práticas de controlo e não prejudica o meio ambiente (Fancelli, 2003). Habitualmente, os nematologistas relacionam as respostas do hospedeiro ao parasitismo dos nemátodes com a capacidade da planta em suportar a reprodução do nemátode.

Cook & Evans, 1987 in Wesemael & Moens, 2011, definiram uma planta que não permite a reprodução de nemátodes como completamente resistente, e uma planta que permite que os nemátodes se multipliquem livremente como não resistentes ou suscetíveis. Os autores descreveram uma planta tolerante como uma planta que sofre somente uma pequena lesão, mesmo quando fortemente infetada com nemátodes, e uma planta intolerante como uma planta que sofre muitos danos.

A situação mais aconselhada seria a utilização de cultivares produtivas que apresentassem resistência contra nemátodes constituindo um importante método de controlo em áreas infestadas. No entanto, é difícil obter cultivares que conciliem a resistência a nemátodes com uma produção quantitativa e qualitativamente desejável.. As cultivares parcialmente resistentes que existem no mercado também muitas vezes não alcançam bons parâmetros de produção. O uso sistemático de cultivares resistentes é ainda desaconselhável, pois há a possibilidade de surgirem populações de nemátodes capazes de parasitar tais plantas (Franzener, 2005). Para além do mais, a sua recomendação pode ser limitada a determinadas regiões de acordo com o clima e solo favoráveis à cultura (Freitas et al., 2001). Desta forma, em relação à utilização de variedades resistentes, deve-se considerar

que ela é de grande importância, porém, aliada à rotação de culturas e outras formas de controle (Antônio, 1992).

Considera-se que a presença do gene *Mi*, que já foi identificado há mais de cinquenta anos, confere resistência às plantas de tomateiro infestadas pelos NGR *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Gilbert & McGuire, 1956). Os nemátodes são atraídos e penetram nas raízes, depois migram para o cilindro vascular. Porém, nas plantas resistentes não há formação do local de alimentação, impossibilitando o J2 de desenvolver o parasitismo. Em contrapartida, desenvolve ao redor da região anterior dos juvenis que penetraram, ou próximo do local onde as células de alimentação poderiam ser incitadas, uma região de células necróticas, sendo essa reação designada de hipersensibilidade (Dropkin, 1969).

A resistência mediada pelo gene *Mi* é eliminada a temperaturas superiores a 28°C. Segundo Williamson (1998), plantas que contêm o referido gene foram inoculadas e mantidas a temperatura restritiva de 32°C durante dois dias e depois foram mantidas a temperatura adequada de 27°C durante um mês. No final da experiência as plantas continham galhas e ovos em grande quantidade. Assim esta experiência indicou que a determinação de resistência ocorre nas primeiras 24-48 horas após a infecção, e que, passado esse período a resistência não é reestabelecida, mesmo a temperaturas mais baixas.

Esse gene constitui-se num dos mais complexos e bem caracterizados genes de resistência a nemátodes fitoparasitas e é considerado um ótimo exemplo da utilização de resistência do hospedeiro para reduzir eficazmente a necessidade de aplicação de produtos químicos de síntese. Portanto, este é muito utilizado no desenvolvimento de cultivares de tomateiro. No entanto, o gene *Mi* não é eficaz contra todas as espécies de nemátodes, e a insuficiência desse gene a altas temperaturas (a partir de 28°) pode ser um problema no campo (Williamson, 1998).

### 1.3 Enxertia de hortícolas

#### Conceito de enxertia de hortícolas

A enxertia é a união de duas partes de tecido vegetal de plantas vivas compatíveis que conduzem ao crescimento e desenvolvimento de uma única planta, sendo o conceito de compatibilidade definido como a capacidade de duas plantas diferentes, unidas pela enxertia, funcionarem satisfatoriamente como uma única planta (González, 1999). O sucesso da enxertia resulta do contacto íntimo do câmbio das duas plantas, designadamente: da planta enxerto, que irá desenvolver a parte aérea, e da planta porta-enxerto, responsável pelo sistema radicular (Mourão & Brito, 2014). De facto, não existe nenhum método capaz de prever o resultado de uma enxertia, no entanto, quanto maior a afinidade botânica entre as espécies, maior a probabilidade de sobrevivência do enxerto (Goto, 2003).

À medida que os problemas de solo aumentam nas estufas e as soluções fitossanitárias diminuem, as plantas enxertadas têm cada vez mais procura, quer pela resistência que conferem a doenças radiculares quer pelo aumento da capacidade das plantas em ciclos de longa duração (FLF, 2010). Desta forma, a enxertia proporciona uma maior resistência a diversas doenças do solo, nomeadamente, a podridão da raiz (*Pyrenochaeta lycopersici*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pseudomonas solanacearum*, *Verticillium albo-atrum* e nemátodes (Peil, 2003). Poderá possibilitar ainda uma maior tolerância a temperaturas agrestes e inconstantes, proporcionando também uma maior resistência a características perniciosas do solo, como seja, a salinidade (Brandão et al., 2003).

Para o controlo dos agentes patogénicos, a utilização desta técnica é bem tolerada pelas plantas quando comparada com outras técnicas, nomeadamente, a solarização, o vapor de água e até mesmo a pulverização de produtos químicos (Brandão et al. 2003).

No processo de enxertia, o tecido recém-cortado do enxerto, com capacidade de atividade meristemática, estabelece um contacto seguro e íntimo com o tecido similar recém-cortado do porta-enxerto. As células enxertadas da região do câmbio dão início à produção de células parenquimáticas que posteriormente se misturam e entrelaçam, originando o tecido *callus*. Nas combinações compatíveis gera-se a reabsorção da capa necrótica antes da formação dos plasmodesmos secundários entre as células, junto aos feixes vasculares formados. Determinadas células do calo diferenciam-se em células

novas do câmbio. Essas novas células formam novo tecido vascular, ou seja, o xilema no interior e o floema no exterior, estabelecendo-se desta forma uma nova conexão vascular entre o enxerto e o porta-enxerto. Frequentemente, no início da união formam-se anastomoses, ou seja, pontes entre os feixes vasculares, no entanto, o câmbio só é completamente reconstituído no final da segunda semana. Nas hortícolas, este processo de união pode ser observado um dia após a enxertia e termina entre uma a três semanas depois, dando-se a completa conexão do sistema vascular do floema e do xilema. De três a sete dias pode ser visível a formação do calo. A formação da união do enxerto termina quando o golpe cicatriza e se estabelece a circulação de água e nutrientes da raiz para a parte aérea e fotoassimilados da parte aérea para a raiz (Miguel, 1997).

### **Objetivos da enxertia herbácea**

A enxertia herbácea é uma técnica utilizada mundialmente e com grande ascensão. O objetivo desta técnica consiste na obtenção de maior resistência a doenças do solo, possibilitando o cultivo de determinadas espécies hortícolas em áreas por vezes contaminadas por agentes patogénicos do solo. Tem, assim, como finalidade, impedir o contacto da planta sensível com o agente patogénico. Enxerta-se uma cultivar comercial num porta-enxerto resistente, pertencendo a outra cultivar, ou espécie da mesma família botânica (Hoyos, 2000; Lee et al., 2010).

O porta-enxerto resistente escolhido, mantém-se vigoroso durante todo o ciclo cultural, adquirindo as funções vitais de absorver água e nutrientes do solo, ao mesmo tempo em que a cultivar comercial da planta enxerto, por vezes sensível a um determinado patogénico se produz (Hoyos, 2000; Lee et al., 2010). Logo, esta é uma técnica alternativa a outros métodos de controlo de doenças prejudiciais ao Homem e ao meio ambiente, como seja, o uso indiscriminado de pesticidas cujo alvo são doenças de origem edáfica.

As plantas enxertadas prontas a transplantar podem resolver muitos dos problemas decorrentes do cultivo convencional, a rápida disseminação de doenças causadas por sucessivas culturas, os danos causados pelas baixas temperaturas do solo durante os primeiros estágios de desenvolvimento, utilização intensiva de pesticidas e fertilizantes químicos e um uso mais económico e sustentável da água para rega. Para os produtores biológicos, as sementes de ambas as partes da planta (planta enxerto e planta porta-

enxerto) deveriam ser tratadas com calor seco, para eliminar possíveis doenças transmitidas por sementes, tais como, *Fusarium* e vírus. (Hoyos, 2000; Lee et al., 2010).

Para a prevenção de doenças do solo, a utilização da técnica de enxertia é a mais adequada, em relação às restantes técnicas, nomeadamente, a solarização, a utilização de vapor de água, pulverizações com produtos químicos e até mesmo, a opção pela hidroponia, pois o uso da enxertia não exige uma mudança radical na produção da cultura. O produtor, desta forma, não precisa de grandes conhecimentos para a realização de cálculos, nem de equipamentos adicionais nem sequer preocupar-se com a eliminação de resíduos, para não causar danos ao meio ambiente (Hoyos, 2000; Lee et al., 2010).

Relativamente à interação entre a enxertia e as condições ambientais, os estudos têm mostrado a tolerância das plantas à salinidade em ambientes protegidos. A enxertia proporciona, assim, maior tolerância das culturas à salinidade, aumentando também a capacidade de absorção de água e nutrientes.

Esta técnica no geral proporciona ainda melhor qualidade dos frutos, pois os frutos das plantas enxertadas em porta-enxertos específicos perdem a cerosidade e ficam com brilho, tornando-os mais atraentes ao consumidor (Goto, 2003).

### **A enxertia de culturas hortícolas na Europa**

A técnica de enxertia é praticada em árvores de fruto há milhares de anos, no entanto, a enxertia de hortícolas só foi recentemente adaptado à escala comercial (Sakata et al., 2007 in Lee, et al., 2010).

A produção vegetal de plantas enxertadas prontas a transplantar teve origem no Japão e Coreia, com o intuito de evitar as perdas graves de culturas causadas por doenças do solo, agravadas por cultivos sucessivos (Lee et al., 2010).

A enxertia de culturas hortícolas na Europa, iniciou-se em meados do séc. XX, com a enxertia para a cultura da melancia (Bogoescu et al., 2010) e do tomateiro (Gonzáles, 1999).

O recurso à técnica de enxertia, concretamente dos produtos hortícolas, teve início na década de 1940, na Holanda, (González, 1999; Peil, 2003). Incidiu principalmente no cultivo de tomateiro, conseguindo-se dessa forma melhorar eficazmente a resistência a doenças radiculares e também aumentar fortemente a capacidade da planta em ciclos de

longa produção (Rodrigues, 2009). Nos anos 60, começaram a ser desenvolvidos trabalhos tendo em vista a enxertia de solanáceas. Em França, começam também nos anos 60 os primeiros trabalhos em enxertia de solanáceas, principalmente em tomate (Mourão & Brito, 2014).

Relativamente à enxertia de tomateiro, esta verificou-se a partir da década de 90, inicialmente em cultivares sem resistências, como por exemplo, cultivares de tomateiro do tipo Raf (Mourão & Brito, 2014). Esta mesma técnica foi posteriormente introduzida noutros países ocidentais na primeira década de 1990 e está a ser globalmente praticada, usando cultivares de plantas enxerto locais, que depois são introduzidas nas plantas porta-enxerto (Lee et al., 2010).

A enxertia de hortícolas foi adaptada de forma segura para a produção em modo de produção biológico, sendo uma prática sustentável do ponto de vista ambiental e minimizando a utilização indesejável de resíduos agroquímicos. O número de produtores bem como a dimensão da área cultivada com plantas enxertadas prontas a transplantar, tem vindo a aumentar, refletindo significativamente nas preferências dos agricultores por este tipo de plantas, de alta qualidade e melhor desempenho (Lee et al., 2010).

### **A enxertia de culturas hortícolas em Portugal**

A enxertia de culturas hortícolas em Portugal é relativamente recente. Os primeiros ensaios de enxertia a nível das empresas de produção de plantas foram realizados em 1999, com plantas de tomateiro, posteriormente de melancia e pepino, no ano de 2002. No entanto, foi somente em 2007 que se iniciou a produção de tomate comercial baseado em plantas enxertadas (Rodrigues, 2009). A partir daí, a procura por plantas enxertadas para culturas protegidas tem aumentado expressivamente. (Mourão & Brito, 2014).

Em Portugal, no ano de 2009, foram plantadas cerca de 170 ha, correspondendo a 1 200 000 plantas de tomateiro enxertado nas estufas e em 2010, estimava-se uma área de 220 ha (FLF, 2010). Para além das culturas referidas a partir de plantas enxertadas, têm aumentado em termos de superfície cultivada, outras culturas, designadamente, o pepino, pimento, melão e feijão-verde.

## **Propriedades de um porta-enxerto**

O porta-enxerto pode induzir resistência/ tolerância a várias doenças de solo (Rivard e Louws, 2008), como *Pyrenochaeta lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Ralstonia solanacearum*, *Verticillium albo-atrum*, e também pode proporcionar resistência a nemátodes (Peil, 2003) e vírus do mosaico do tabaco (Neshev, 2007). A absorção e/ou a eficiência de utilização de nutrientes pelas plantas pode também ser melhorada pela enxertia com determinados porta-enxertos, o que permite uma menor aplicação de fertilizantes minerais, bem como uma maior tolerância à salinidade, ou ainda, diminuir os sintomas de stresse de nutrientes (Colla et al., 2010; Fan et al., 2011; Savvas et al., 2010, 2011; Schwarz et al., 2013 in Mourão & Brito, 2014).

Um porta-enxerto deve evidenciar resistência à doença que se tenciona controlar bem como aos agentes patogénicos do solo, devendo ainda considerar-se as condições morfológicas para a realização da enxertia (Peil, 2003).

Na generalidade, um porta-enxerto saudável deverá reunir determinadas características, nomeadamente, a imunidade à doença que se pretende controlar, quando este for o objetivo da enxertia; boa resistência aos restantes patogénicos do solo; vigor e rusticidade; boa afinidade com a cultivar enxertada; boas condições morfológicas (tamanho certo do hipocótilo no momento da enxertia, consistência, etc.). Com um porta-enxerto são, a planta enxertada tem grande probabilidade de ser sã, o que permite diminuir a densidade de plantação, sem que haja prejuízos à produção (Peil & Gálvez, 1999).

Referentemente à utilização de enxertia com porta-enxertos resistentes na produção biológica de tomate, tem sido avaliada como substituto da desinfeção do solo por vapor, com resultados de eficácia comparáveis na redução de doenças radiculares e, ainda, com aumentos de produtividade (Theodoropoulou et al., 2007).

## **Porta-enxertos de tomateiro e o gene “Mi”**

Um dos genes mais estudados e que confere resistência a NGR é o gene *Mi*, obtido a partir de um tomateiro selvagem (Williamson, 1998). Este gene já foi introduzido em porta-enxertos de tomateiro, mas ainda não está disponível no mercado um porta-enxerto totalmente resistente a NGR. Além disso, a resistência conferida pelo gene *Mi* é ultrapassada a temperaturas acima dos 28 °C e quebrada por várias populações de NGR

(Trudgill & Blok, 2001). Contudo, algumas populações de nemátodes superaram a resistência conferida pelo gene *Mi* à medida que se tornaram virulentas para esse mesmo gene (Roberts et al., 1990; Castagnone-Sereno, 1994; Kaloshian et al., 1996).

Segundo o artigo de Costa (2015) vários dos porta-enxertos de tomateiro disponíveis comercialmente, por exemplo, derivam de cruzamentos de tomateiro domesticado *Solanum lycopersicum* com tomateiros selvagens, como *Solanum habrochaites*, que têm naturalmente mecanismos de resistência ou tolerância aos NGR (Williamson, 1998). Tal como refere Costa (2015), embora os NGR consigam infetar as plantas e multiplicar-se, não atingem elevados níveis populacionais nem causam prejuízos significativos à produção. Ainda referido no mesmo artigo apesar de uma forma aparente estes porta-enxertos terem somente um sucesso pouco eficaz, poderão, no entanto, ter bastante utilidade se forem conjugados com outros meios de controlo que atuem satisfatoriamente sobre populações baixas de nemátodes fitoparasitas. Neste âmbito, merecem especial interesse os agentes de controlo biológico como a bactéria *Pasteuria penetrans* ou o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Costa, 2015). Estes microrganismos têm sido indicados como responsáveis pela redução das populações de NGR em solos naturalmente supressivos ou mesmo em sistemas naturais (Costa et al., 2012). O fungo *P. chlamydosporia*, que coloniza estádios sedentários de NGR, tem potencial para desenvolver uma interação próxima com algumas plantas, colonizando largamente a rizosfera associada e até o interior das raízes (Lopez-Llorca et al., 2002 in Costa, 2015). Quando há uma satisfatória compatibilidade entre o porta-enxerto e *P. chlamydosporia*, será possível produzir em viveiro plantas já colonizadas endofiticamente pelo fungo. Desta forma permitirá supostamente evitar a inoculação de grandes números de esporos no campo e minimizar os problemas de estabelecimento do fungo na rizosfera, aspetos que são apontados como limitadores do seu potencial papel como agente de controlo biológico (Costa, 2015).

A grande dificuldade em desenvolver novas cultivares com resistência total a NGR poderá dever-se à elevada plasticidade genética dos NGR (Castagnone-Sereno & Danchin, 2014), que potencialmente ultrapassarão inclusive o efeito de cultivares totalmente resistentes que venham a surgir (Costa, 2015).

A resistência oferecida pelas próprias plantas é atualmente considerada como um método alternativo e ecológico para controlar agentes patogénicos transmitidos pelo solo. A resistência genética tem sido eficaz contra NGR em tomateiro (Messeguer et al., 1991). As plantas de tomateiro cultivadas são naturalmente suscetíveis aos NGR, mas algumas



das cultivares de tomateiro relacionadas com *S. peruvianum* possuem um único gene dominante (*Mi*) que confere resistência ao NGR (Medina-Filho & Stevens, 1980; Roberts e Thomason, 1986; Messeguer et al., 1991). Este gene de resistência controla as três principais espécies de NGR *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* em tomateiro (Roberts e Thomason, 1986).

As cultivares de tomateiro que transportam o gene *Mi* têm por vezes características hortícolas indesejáveis, como seja o tamanho do fruto menor. Para superar essas características negativas, as cultivares comerciais suscetíveis são enxertadas em porta-enxertos portadores do gene *Mi*. Os porta-enxertos de tomateiro que transportam o gene *Mi* controlam efetivamente NGR, quando comparados com plantas suscetíveis não enxertadas (Lee, 1994; Lopez-Perez et al., 2006).

Assim sendo, cultivares resistentes e métodos de enxertia têm-se tornado alternativas importantes para o controlo de NGR na cultura do tomateiro, uma vez que os porta-enxertos têm sistemas radiculares mais vigorosos do que os das cultivares de tomateiro suscetíveis ou resistentes (Dropkin, 1969). Estes porta-enxertos proporcionam assim maior tolerância ao ataque causado por nemátodes. As vantagens adicionais do uso de porta-enxerto são as de que as plantas enxertadas têm todas as características agronómicas das variedades cultivadas e são uma alternativa mais económica do que os tratamentos químicos, outra vantagem é de que o porta-enxerto proporciona maior tolerância a fatores de stress e oferece uma maior produtividade (Ioannou, 2001; Lee, 2003).

Segundo um estudo levado a cabo sobre a resposta de porta-enxertos de tomateiro com o gene de resistência *Mi* para *Meloidogyne incognita* raça 2 a diferentes temperaturas do solo, os porta-enxertos resistentes aos NGR têm sido comumente usados pelos produtores de tomate para controlar os mesmos (Deveran et al, 2010). No entanto, o facto da resistência oferecida ao NGR estabilizar com o aumento da temperatura (até aos 28°C), ainda é um problema e isso requer mais atenção na cultura do tomateiro. Assim, o desenvolvimento de porta-enxertos contendo um gene que permaneça estável ao aumento da temperatura do solo deve ser uma prioridade para controlar os NGR em tomateiros cultivados a altas temperaturas do solo. Isto permitirá o plantio antecipado e prolongará o ciclo produtivo (Deveran et al, 2010).

Uma gama de cultivares de tomateiro e porta-enxertos com resistência contra *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* estão disponíveis. A resistência nestas cultivares de tomateiro é baseada na presença do gene dominante único *Mi* que foi introgressado na

cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pela cultivar selvagem *S. peruvianum* (Medina-Filho e Stevens, 1980). A resistência oferecida pelo gene Mi desencadeia uma resposta hipersensível que leva à morte celular logo após os nemátodes iniciarem a sua alimentação perto do feixe vascular (Dropkin, 1969).

O cultivo de cultivares resistentes a nemátodes tem um duplo propósito: o de evitar danos nas culturas e o de reduzir os níveis de população. Como tal, as cultivares resistentes também podem ajudar ao crescimento de culturas suscetíveis (Colyer et al., 1998; Hanna, 2000; Ornat et al., 1997).

#### **1.4. Objetivos do trabalho**

Os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), *Meloidogyne* spp., são parasitas obrigatórios de elevado impacto económico a nível mundial e causam perdas na quantidade e qualidade da produção de diversas plantas hortícolas. A espécie *M. incognita* tem sido amplamente estudada pela ubiquidade da sua distribuição, vasto leque de hospedeiros, e pela sua rápida multiplicação partenogenética que lhe permite aumentar exponencialmente os níveis populacionais em condições favoráveis, causando graves danos nas culturas.

Entre as culturas afetadas pelos NGR, o tomateiro, *Solanum lycopersicum*, é considerado um ‘hospedeiro universal’, podendo ocorrer uma quebra de produção até 100%, em condições de cultura protegida de tomate para consumo em fresco. As infestações de NGR foram tradicionalmente controladas através da aplicação de nematodocidas de síntese, como sejam, o brometo de metilo e o metame-sódio, que têm vindo a ser banidos devido à sua elevada toxicidade. Não estando disponíveis alternativas com a eficiência dos nematodocidas químicos, os problemas com NGR têm vindo a aumentar na Europa. Entre os meios sustentáveis de proteção de culturas hortícolas, a utilização de porta-enxertos tolerantes/resistentes é uma prática promissora para o controlo de algumas doenças de origem edáfica e tem-se vulgarizado na cultura protegida de tomateiro nos últimos anos. É uma técnica de fácil implementação e aceite em produção biológica.

Inserido no 2º ano do curso de Mestrado em Agricultura Biológica, este ensaio foi realizado numa câmara Fitoclima no laboratório da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, em Refóios do Lima. Teve como principal objetivo, conhecer a reação hospedeira de sete cultivares comerciais de porta-enxertos de tomateiro (Auroch, Imperador, King Kong, Maxifort, Actimino, Multifort e Silex), designados pelas empresas produtoras

como tendo resistência parcial ou intermédia a NGR, nomeadamente a *M. incognita*. Utilizou-se ainda as cvs. Moneymaker e Coração de Boi como testemunhas. Assim, realizaram-se ensaios em vasos, em condições controladas numa câmara Fitoclima (temperatura constante de 25°C, fotoperíodo de 16h/8h), seguindo a metodologia padrão de avaliação de reação hospedeira de tomateiro a NGR (Sasser et al., 1984).

Este estudo enquadra-se no âmbito do Projeto COCOON- “Combined sustainable strategies for root-knot nematode management in protected crops” (POCI-01-145-FEDER-01661 e PTDC/AGR-PRO/3438/2014).

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Manutenção da população de *Meloidogyne incognita***

A população de nemátodes de *Meloidogyne incognita*, AM31, foi cedida gentilmente pela Doutora M. Clara Vieira dos Santos do Laboratório de Nematologia da Universidade de Coimbra, coordenadora do projeto COCOON (POCI-01-145-FEDER-01661 e PTDC/AGR-PRO/3438/2014). Esta população tem sido propagada e multiplicada de dois em dois meses, através da inoculação com 10 massas de ovos em tomateiros suscetíveis da cultivar Tiny Tim. Inicialmente foram lavadas as raízes de tomateiros da cultivar Tiny Tim infetados com a população de nemátode, foram colhidos 10 massas de ovos à lupa com uma pinça e foram transferidos para novos tomateiros com dois pares de folhas verdadeiras, em vasos de 0,5 l com uma mistura de solo e areia (1:1) esterilizados.

### **2.2 Avaliação da reação hospedeira de cultivares de porta-enxerto de tomateiro a *Meloidogyne incognita***

#### **2.2.1 Obtenção do inóculo**

A obtenção do inóculo de *Meloidogyne incognita* foi feita segundo a metodologia de Hussey & Barker (1973). Começou-se por desenvasar tomateiros infetados da cv. Tiny Tim (Anexo 1.6) (os quais continham as massas de ovos visíveis). Posteriormente procedeu-se à lavagem das raízes com água da torneira para um recipiente, no sentido de as libertar de partículas de solo aderentes, tendo assim o cuidado de desinfetar a solução de lavagem com um pouco de hipoclorito de sódio antes de a devolver ao ambiente. De seguida, cortou-se as raízes lavadas em pedaços de cerca de 2-3 cm, tendo o cuidado de cortar também as galhas grandes a meio, pois estas poderiam conter massas de ovos no seu interior. As raízes foram transferidas para um frasco Schott de 500 ml de capacidade, adicionando-se então 200 ml de hipoclorito de sódio a 0.5 % em água da torneira. Colocou-se a tampa no frasco e agitou-se vigorosamente durante dois minutos. Imediatamente transferiu-se o conteúdo do frasco para um conjunto de crivos metálicos, o superior de 75 µm (que recolhe detritos e pedaços de raiz) e o inferior de 20 µm (onde é retida a suspensão de ovos). Foi passado bem por água o conteúdo dos crivos para eliminar o hipoclorito de sódio e, de seguida, recolheu-se a suspensão de ovos retida no crivo de 20 µm com um esguicho de água, para um copo graduado de 250 ml de

capacidade. Prontamente, ajustou-se o volume da suspensão com água destilada a um volume conhecido (p.e. 100 ml) e manteve-se em agitação num agitador magnético.

Procedeu-se seguidamente à quantificação, ao microscópio invertido e com uma ampliação de 50x, dos ovos (ignorando ovos sem conteúdo) e jovens de segundo estágio (J2) de NGR em três amostras de 1 ml da suspensão obtida. Por fim, calculou-se o número de ovos e J2 total e o volume da suspensão a inocular por vaso para obter pelo menos 5000 ovos e J2 por vaso.

## **2.2.2 Obtenção das plantas**

As sementes das sete cultivares de porta-enxerto de tomateiro utilizadas neste ensaio foram cedidas pelos representantes portugueses das empresas de sementes respetivas (Actimino F1– Enza Zaden; Auroch – Sakata; Emperador e King Kong– Rijk Zwaan; Maxifort e Multifort – de Ruiter/Monsanto; Silex- Fitó). Foram ainda utilizadas as cultivares de tomateiro reconhecidamente suscetíveis Coração de Boi e Moneymaker, que foram adquiridas em casas especializadas. Para a obtenção das plantas de tomateiro procedeu-se inicialmente à preparação dos vasos. Para tal, foi feita a desinfecção com lixívia diluída dos vasos de plástico, com uma capacidade de cerca de 80 ml (para germinação de sementes e obtenção de plântulas) e 0,5L (para condução do ensaio). De seguida foram tapados os furos da base do vaso (lado exterior) com fita adesiva. Misturou-se solo e areia (1:1), autoclavados a 122 °C por um período de uma hora, enchendo-se os vasos com essa mistura. Foi iniciada a rega com água da torneira conforme o necessário para manter o solo bem humedecido, mas não encharcado. A fertilização foi feita com Substral (NPK: 6-3-6) de 15 em 15 dias.

Algumas das sementes utilizadas (cv. Actimino, Emperador, King Kong e Maxifort) foram fornecidas peletizadas, embora não tratadas com produtos fitofarmacêuticos. Estas foram colocadas a re-hidratar num recipiente com água destilada durante 2 minutos, com o objetivo de separar a pelet da semente socorrendo da ajuda de uma pinça. A pré-germinação das sementes foi feita numa caixa de petri, em papel absorvente bem humedecido com água, estas foram distribuídas de forma uniforme. Selou-se a caixa de petri com parafilm e esta foi colocada numa câmara de crescimento (Fitoclima 2500 EDTU – aralab- Anexo 1.5) a 25°C; quando estas atingiram uma radícula entre 1 a 2 cm transferiu-se as sementes pré-germinadas (Anexos 1.1 e 1.2) para vasos com capacidade de 80 ml (Anexo 1.3).

Quando as plântulas atingiram o estágio de dois pares de folhas verdadeiras (Anexo 1.4), o que demorou aproximadamente um mês, foram transplantadas para vasos de maior capacidade (0,5L), para iniciar assim o ensaio. As plantas foram sempre mantidas no Fitoclima a 25° C e com o fotoperíodo de 16h (dia) e 8 h (noite) (Anexo 1.7 e 1.8).

Subsequentemente inoculou-se as plantas com ovos e J2, distribuindo a suspensão obtida anteriormente por três furos feitos no solo do vaso a inocular, até à zona da raiz (cerca de 3 cm de profundidade). O substrato do vaso a inocular não estava muito húmido, pois não foi regado no próprio dia nem no dia anterior. Manteve-se a suspensão de ovos e J2 em agitação num agitador magnético, pipetando o volume necessário, variando de acordo com a concentração da solução para totalizar 5000 ovos e J2. Foi distribuído o volume necessário pelos três furos, tapando-se estes com o substrato do vaso e, de seguida, este foi regado com água da torneira. Cada vaso foi colocado dentro de um saco de plástico para evitar contaminações aquando da rega.

### **2.2.3 Desenho experimental**

Foram testadas as sete cultivares de porta-enxerto de tomateiro Actimino, Auroch, Emperador, King kong, Maxifort, Multifort e Silex. De cada cultivar, inocularam-se 6 plantas com *M. incognita* da população AM31 e 6 não inoculadas, constituíram a testemunha negativa, para averiguar os efeitos causados pela inoculação de nemátodes. Foram ainda utilizadas plantas das cultivares de tomateiro Coração de Boi e Moneymaker como referência de reação suscetível aos nemátodes. O ensaio decorreu uma parte com as cultivares Auroch, Emperador, King Kong, Maxifort e Money Maker na câmara de crescimento em condições controladas, nas condições referidas anteriormente, sendo as plantas regadas com água da torneira, conforme as necessidades, até ao fim do ensaio. Uma outra parte do ensaio, decorreu numa sala do laboratório com condições menos controladas, com as cultivares Actimino, Coração de Boi, Multifort e Silex, com os condicionalismos decorrentes do local, nomeadamente, a temperatura ambiente e iluminação natural. Tendo em consideração as características do local do ensaio não foi praticável um ambiente isolado e controlado tal como aconteceu na câmara de crescimento, potenciando desta forma um maior risco de incidência de pragas e doenças nas plantas.

Finalmente, é de salientar que a fertilização foi feita com Substral NPK (6-3-6) de 15 em 15 dias em ambos os locais de ensaio. Nas duas partes do ensaio, os vasos foram distribuídos de forma aleatória. Os ensaios decorreram por cerca de 60 dias.

#### **2.2.4. Parâmetros avaliados**

Foram avaliados no ensaio parâmetros relativos à parte aérea e raiz da planta e do solo. Assim, decorridos 60 dias após a inoculação, foi cortada a parte aérea das plantas a cerca de 1 cm do solo, tendo-se determinado o comprimento, o número de folhas, o peso fresco e seco. Desta forma, para cada planta, determinou-se o peso fresco da parte aérea e da parte radicular, sendo também determinados os pesos secos correspondentes, depois da secagem numa estufa a 50 °C. Desenvasaram-se de seguida as plantas, reservando o solo; foi determinado o volume total de solo, separando-se então 100 ml de solo de cada vaso, para a extração de J2, através do método do tabuleiro (Whitehead e Hemming, 1965) (Anexo 1.11). Separou-se as folhas de papel tissue e colocou-se uma a duas folhas por cima de uma rede de plástico num tabuleiro. Seguidamente transferiu-se 100 ml de solo do vaso para o papel espalhando-se uniformemente e dobrou-se as bordas do papel de forma a evitar que o solo saísse. Foi então adicionada água da torneira ao tabuleiro até inundar o solo. Decorridas 48 h, deslocou-se a rede deixando a água escorrer durante alguns minutos, sendo então a rede retirada e o solo eliminado. Procedeu-se à crivagem da suspensão resultante com a utilização de um crivo de 20 µm, recolhendo-se a suspensão de nemátodes retida no crivo com um esguicho de água para um frasco de 50 ml de capacidade; o volume da suspensão obtida variou entre 10 a 20 ml. Por fim, quantificou-se ao microscópio invertido os jovens de J2 no total da suspensão, sendo então calculado o número total de J2 no volume total de solo de cada vaso.

As raízes foram lavadas à torneira para eliminar as partículas de solo aderentes e imersas durante 15 minutos numa solução de floxina B a 0,0015% (Hartmann et al., 1983) (A1.10) para evidenciar as massas de ovos. Depois de lavadas em água da torneira para eliminar o excesso de corante, foram observadas ao microscópio estereoscópico para quantificar as galhas e massas de ovos de NGR. Foi depois retirado o excesso de humidade da raiz com papel absorvente e determinou-se o peso fresco seco. Por fim, extraiu-se os ovos de cada raiz utilizando o método descrito anteriormente para obtenção de inóculo.

### 2.2.5 Índices de reação hospedeira

Baseado no número de galhas e massas de ovos observadas, atribuiu-se o índice de galhas (GI) e de massas de ovos (EI), respectivamente, de acordo com o quadro 2.1 (Taylor & Sasser, 1978).

**Quadro 2.1.** Escala de correspondência entre o número galhas e de massas de ovos de NGR e os respectivos índices (Taylor e Sasser 1978).

Nº de galhas ou massas de ovos	Índice de galhas (GI) ou massas de ovos (EI)
0	0
1-2	1
3-10	2
11-30	3
31-100	4
>100	5

A eficiência de cada cultivar como hospedeira foi avaliada com base nos seguintes índices: fator de reprodução (Rf) (Sasser *et al.*, 1984), índice de reprodução relativa (RI) (Taylor & Sasser, 1978) e índice de massas de ovos (EI) (Hadisoeganda & Sasser, 1982), conforme indicado nos quadros 2.2 e 2.3.

O valor de Rf foi calculado pela razão entre a densidade populacional final de nemátodes (Pf), posterior à exposição ao inóculo e a densidade populacional inicial (Pi). O valor de Pf combinou o número total de ovos estimado por raiz com o número de J2 presentes no solo; a Pi, fixa, corresponde ao número de ovos e J2 inoculados (5000). Um valor de Rf superior a 1, indica que ocorreu reprodução e a planta poderá ser considerada hospedeira; se a razão for inferior a 1, a planta é normalmente considerada não-hospedeira, o que pode corresponder a reprodução dos nemátodes, mas não da população (Sasser *et al.*, 1984).

O valor de RI obteve-se através da fórmula  $RI = (Rf \text{ test}) / (Rf \text{ padrão}) \times 100\%$ , em que:

- Rf test – fator de reprodução da cultivar testada (população final/população inicial);
- Rf padrão – fator de reprodução da cultivar suscetível da mesma espécie, de referência (valor comparável ao do tomateiro suscetível).

Foi considerado como Rf padrão a média dos valores de Rf obtidos nas cultivares de tomateiro Coração de Boi e Moneymaker.



O valor de EI foi determinado pelo número de massas de ovos observadas em cada planta, que corresponde a um valor tabelado proposto por Taylor & Sasser (1978); tal como descrito no quadro 2.1. Posteriormente, o valor médio de EI para cada cultivar é comparado à escala de classificação de Hadisoeganda & Sasser (1982) no qual se atribuiu o valor de grau de resistência correspondente (quadro 2.3).

**Quadro 2.2.** Classificação da resistência do hospedeiro a NGR, com base no índice de reprodução relativa (RI) (Taylor e Sasser, 1978).

<b>RI (%)</b>	<b>Resistência</b>
0	Imune
1 – 10	Muito resistente (VR)
10 – 25	Moderadamente resistente (MR)
25 – 50	Pouco resistente (SR)
>50	Suscetível (S)

Com base nos índices de massas de ovos médios obtidos, foi determinado o grau de resistência (DR) a *M. incognita*, de acordo com a escala de classificação proposta por Hadisoeganda & Sasser (1982) (quadro 2.3).

**Quadro 2.3.** Escala de classificação do grau de resistência (DR) do hospedeiro a NGR, com base no índice de massas de ovos (EI) (Hadisoeganda e Sasser 1982).

<b>Índice de massas de ovos (EI)</b>	<b>Grau de resistência (DR)</b>
0,0 – 1,0	Altamente resistente (HR)
1,1 – 3,0	Muito resistente (VR)
3,1 – 3,5	Moderadamente resistente (MR)
3,6 – 4,0	Pouco resistente (SR)
4,1 – 5,0	Suscetível (S)

O DR de cada cultivar foi também determinado através do sistema de classificação de Sasser *et al.* (1984), apresentado no quadro 2.4, com base no GI médio e Rf médio, através das designações sugeridas por Canto-Saenz (1983).

**Quadro 2.4.** Classificação do grau de resistência (DR) da planta a NGR, com base no índice de galhas (GI) e no fator de reprodução (Rf), de acordo com as designações propostas por Sasser *et al.* (1984)

<b>Índice de galhas (GI)</b>	<b>Fator de reprodução (Rf)</b>	<b>Grau de resistência (DR)</b>
$\leq 2$	$\leq 1$	Resistente
$\leq 2$	$> 1$	Tolerante
$> 2$	$\leq 1$	Hipersuscetível
$> 2$	$> 1$	Suscetível

Com os dados relativos à reprodução dos nemátodes (Rf, RI e EI) é possível avaliar a eficiência como hospedeiro de cada cultivar (resistência/suscetibilidade), ao passo que o GI fornece uma indicação dos danos causados à planta pelos nemátodes (tolerância, hipersensibilidade). Mediante os dados obtidos, calculou-se também o grau de resistência DR (Sasser et al., 1984).

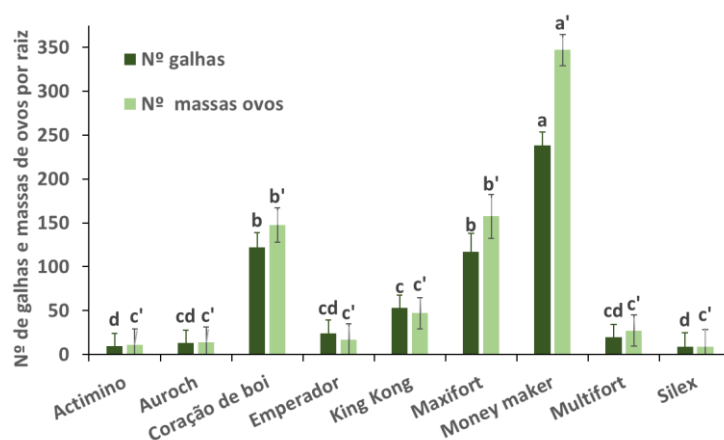
### 2.3. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados com o programa SPSS Statistics 22.0, para o sistema operativo Windows. A homogeneidade de variância foi inicialmente averiguada através do teste de Levene, o que permitiu avaliar se as variâncias da população não eram diferentes. Procedeu-se depois a análises fatoriais para avaliar o efeito do inóculo, comparando as várias cultivares, utilizando a função de ligação identidade, com distribuição normal, através do comando *Modelos lineares generalizados*, à probabilidade de 5%. As diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos foram, então, comparadas entre si através do teste LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher, à probabilidade de 5%. Foram comparadas assim, variáveis contínuas relativas aos parâmetros nematológicos e parâmetros da planta, relativamente aos primeiros foram analisados entre eles, o número de galhas, o número de massas de ovos, o índice de galhas; o fator de reprodução, o índice de reprodução relativa e por fim, a população final, isto é, o número total de ovos e J2 / número de massas de ovos, representativo da fecundidade das fêmeas. No que respeita aos parâmetros da planta, foi analisado para todas as cultivares de porta-enxerto, com e sem inóculo, a altura, o número de folhas, o peso fresco e seco da parte aérea e radicular, e por fim, a razão peso seco da parte aérea/ peso seco da parte radicular.

### 3. Resultados

#### 3.1. Parâmetros nematológicos

Foram detetadas galhas radiculares e massas de ovos do nemátode em todas as plantas inoculadas. Os maiores valores registaram-se na cv. Moneymaker, testemunha positiva ( $p < 0.05$ ), sendo os números de galhas e massas de ovos obtidos na cv. Maxifort comparáveis aos da cv. Coração de Boi, outra das testemunhas positivas (Fig.3.1). Nas restantes cultivares de porta-enxerto de tomateiro, foram encontradas galhas e massas de ovos do nemátode em número significativamente inferior ao das testemunhas positivas.



**Figura 3.1.** Número de galhas e de massas de ovos de *Meloidogyne incognita* por raiz. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Com exceção da cultivar de porta-enxerto Silex, todas as cultivares testadas foram suscetíveis a *Meloidogyne incognita* de acordo com a classificação de Sasser et al. (1984), conjugando um FR superior a 1 com um IG, indicador de danos nas raízes, superior a 2 (Quadro 3.1). O fator de reprodução atingiu o seu valor máximo na cv. Maxifort, indicando que a população final foi mais do que 20 vezes superior à inicial. Este valor foi, no entanto, comparável ao obtido com a cultivar Coração de Boi ( $p > 0.05$ ). Também na cv. King kong se obteve um FR semelhante ao obtido nas testemunhas positivas ( $p > 0.05$ ). Em todas as outras cultivares de porta-enxerto, a reprodução do nemátode foi inferior à observada nos tomateiros reconhecidamente suscetíveis, muito embora se tenha registado uma multiplicação da população de nemátodes em todos os porta-enxertos ( $p < 0.05$ ). O valor do IG foi sempre superior a 2, atingindo o seu valor máximo de 5 na testemunha positiva cv. Moneymaker. Este valor não foi estatisticamente diferente do

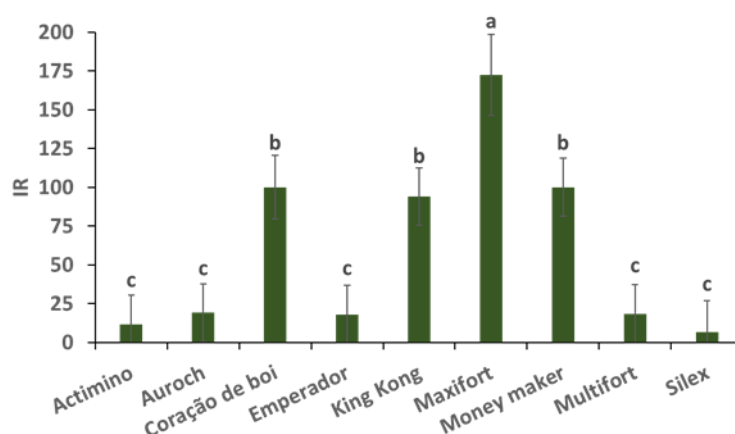
alcançado também para a cv. Maxifort, tendo-se verificado danos inferiores nas raízes causados pelos nemátodes em todas as restantes cultivares de porta-enxerto ( $p < 0.05$ ).

**Quadro 3.1.** Reação hospedeira dos porta-enxertos e das cultivares de tomateiro utilizadas como testemunha positiva (realçadas a verde) segundo Sasser *et al.* (1984).

Cultivar	FR			IG		Reação hospedeira
Actimino	1,7 ±	2,5	c	2,3 ± 0,2	d	Suscetível
Auroch	2,5 ±	2,5	c	2,7 ± 0,2	cd	Suscetível
Coração de boi *	14,7 ±	2,8	ab	4,6 ± 0,2	a	Suscetível
Emperador	2,3 ±	2,5	c	3,3 ± 0,2	bc	Suscetível
King Kong	12,2 ±	2,5	b	3,8 ± 0,2	b	Suscetível
Maxifort	22,4 ±	3,6	a	4,7 ± 0,3	a	Suscetível
Money maker *	13,0 ±	2,5	b	5,0 ± 0,2	a	Suscetível
Multifort	2,7 ±	2,5	c	2,7 ± 0,2	cd	Suscetível
Silex	1,0 ±	2,8	c	2,2 ± 0,2	d	<b>Hipersensível</b>

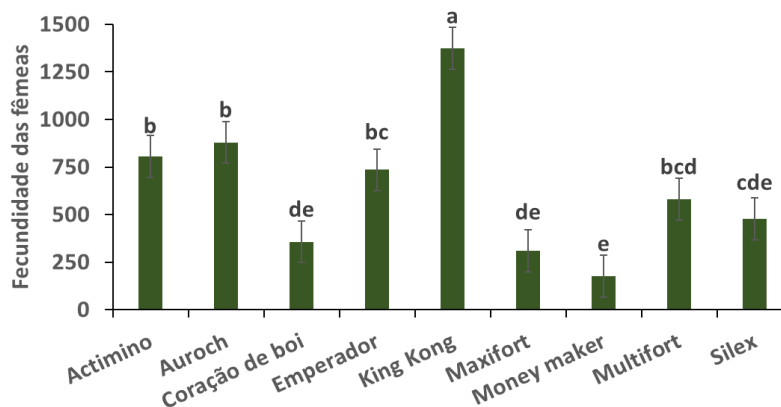
**FR**-Fator de reprodução; **IG**- Índice de galhas; \*Testemunha positiva (suscetível)

A avaliação do índice de reprodução relativa, (Fig.3.2) revela resultados semelhantes aos descritos para o valor de Rf. A cv. Maxifort destaca-se por uma multiplicação do nemátode de cerca de 175% em relação à testemunha suscetível ( $p < 0.05$ ), enquanto que na cv. Kingkong a mesma população de *M. incognita* se multiplicou de forma comparável à testemunha positiva. É, no entanto, de evidenciar que, para as restantes cultivares de porta-enxerto (Actimino, Auroch, Emperador, Multifort e Silex), foi obtido um valor de IR significativamente inferior, que nunca ultrapassou os 25%.



**Figura 3.2.** Índice de reprodução relativa de *Meloidogyne incognita*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

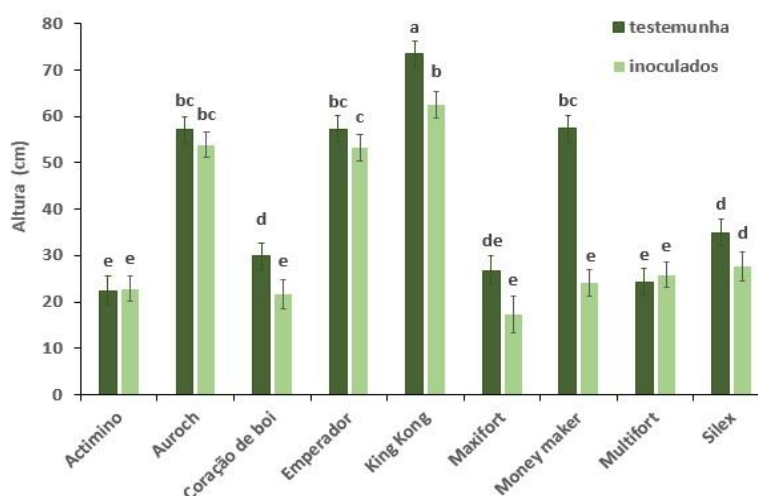
A fecundidade do nemátode, ou seja, o número de ovos que cada fêmea produziu, nas cultivares porta-enxerto foi sempre igual ou superior à obtida nas cultivares testemunha (Fig.3.3).



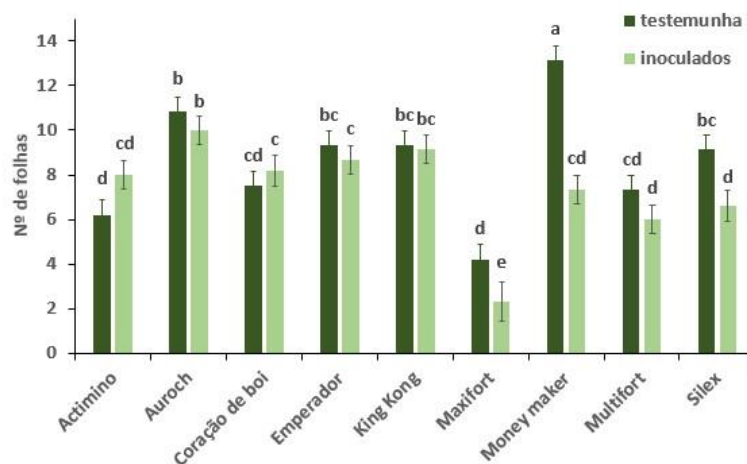
**Figura 3.3.** Fecundidade das fêmeas (população final / número de massas de ovos), representativo da fecundidade das fêmeas de *Meloidogyne incognita*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 3.2. Parâmetros da planta

As plantas das cultivares Coração de boi, King kong e Money maker foram significativamente mais altas nos tratamentos não inoculados, isto é, as plantas não cresceram tanto quando inoculadas (Fig.3.4). As cultivares Maxifort, Money maker e Silex formaram significativamente mais folhas quando não foram inoculadas (Fig.3.5).

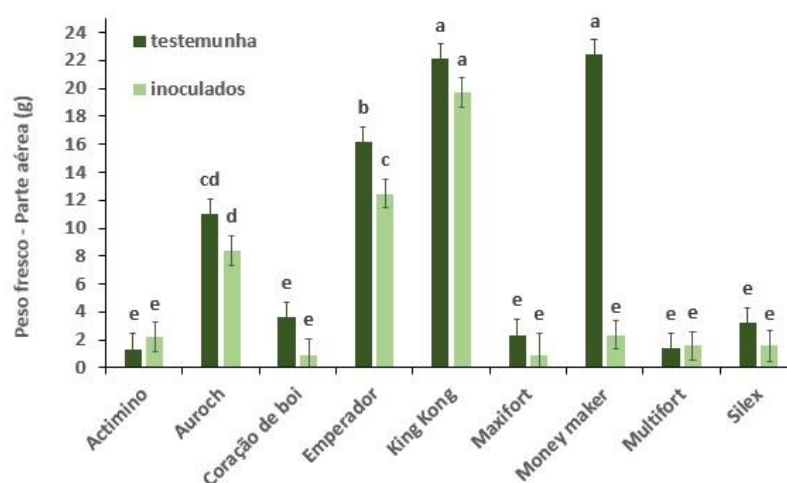


**Figura 3.4.** Alturas em cm das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

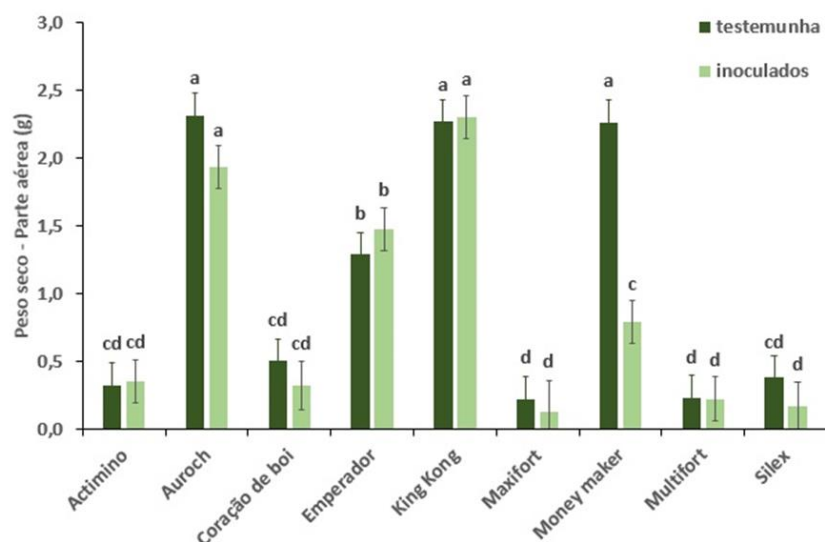


**Figura 3.5.** Número de folhas das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

As plantas das cultivares Emperador e Money maker apresentaram um peso fresco da parte aérea significativamente superior quando não foram inoculadas (Fig.3.6). A cultivar Money maker foi a única de entre as cultivares estudadas em que as plantas apresentaram um peso seco da parte aérea significativamente superior quando não se encontrava inoculada (Fig.3.7).

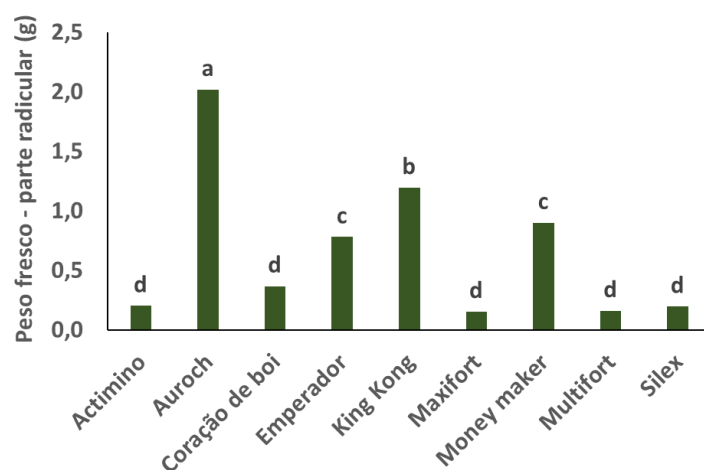


**Figura 3.6.** Peso fresco da parte aérea em gramas das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.7.** Peso seco da parte aérea em gramas das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

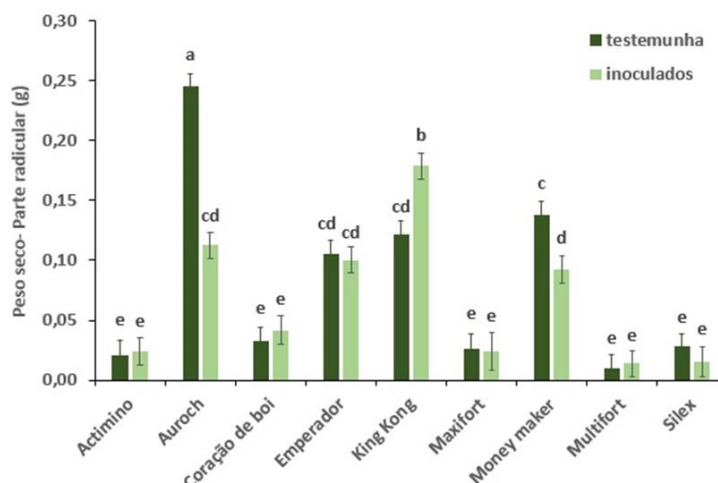
Para o peso fresco da raiz a interação entre os fatores principais cultivar e com ou sem inóculo, não foi significativa. Assim, a análise dos efeitos principais revelou que o peso fresco da raiz foi idêntico para todas as plantas com e sem inoculação (em média 0,7 g/planta), mas ocorreram diferenças significativas entre as cultivares. A cv. Auroch foi a que apresentou o maior peso fresco da raiz, seguida da cv. King Kong e das cv. Imperador e Money maker, sendo idêntico e inferior o peso fresco das restantes cultivares (Fig. 3.8).



**Figura 3.8.** Peso fresco da parte radicular em gramas das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

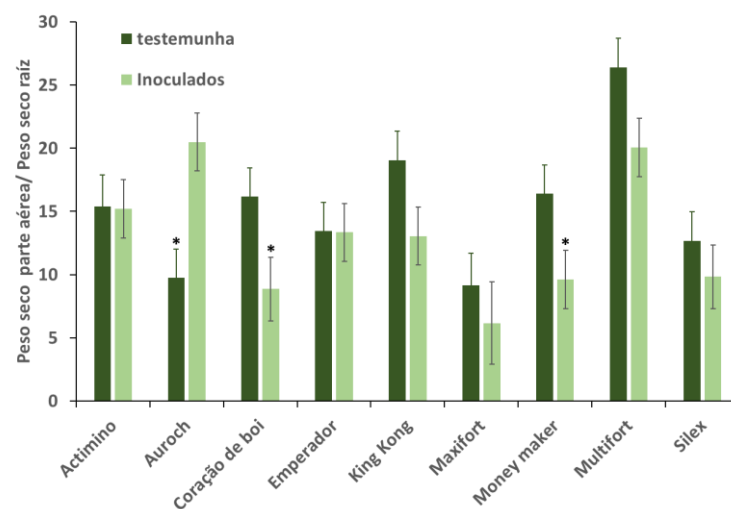


As cultivares Auroch, King kong e Money maker apresentaram, no entanto, diferenças significativas no peso seco da parte radicular. As cultivares Auroch e Money maker tiveram o peso seco da parte radicular das plantas não inoculadas significativamente superior. A cultivar King kong apresentou pesos secos das raízes significativamente superiores nas plantas inoculadas (Fig.3.9).



**Figura 3.9.** Peso seco da parte radicular em gramas das diferentes cultivares, com e sem inoculação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

De um modo geral, a relação entre o peso seco da parte aérea e da parte radicular foi idêntica para as plantas com e sem inoculação, à exceção das cv. Money maker (testemunha) e Coração de boi, e em que essa relação foi inferior nas plantas inoculadas, significando que estas tiveram um menor desenvolvimento da parte aérea (maior investimento na raiz) e, ainda na cv. Auroch, onde as plantas inoculadas apresentaram uma maior relação. Nesta cultivar, aparentemente, a parte aérea das plantas inoculadas foi superior em comparação com as plantas não inoculadas (Fig. 3.10).



**Figura 3.10.** Peso seco da parte aérea / Peso seco da parte radicular das diferentes cultivares, com e sem inoculação. \* indicativo das cultivares que apresentaram diferenças significativas.

### **3.3. Registos do estado fitossanitário das plantas do ensaio do laboratório**

Relativamente à parte do ensaio que decorreu numa sala do laboratório com as cultivares Actimino, Coração de Boi, Multifort e Silex, devido aos condicionalismos já referidos anteriormente houve efetivamente incidência de pragas e doenças nas plantas.

As informações dos registos apresentados em seguida foram baseadas na observação direta das plantas e ainda na observação de partes da planta à lupa, tendo sido feitos registos fotográficos. Foi feita uma abordagem das pragas e doenças que afetaram as plantas, baseada nos pareceres técnico-científicos de toda a equipa do ensaio.

Assim, observou-se no decorrer do ensaio as 48 plantas, tendo-se identificado um aumento do número de plantas afetadas (mortas ou em declínio) em todas as cultivares. Os sintomas de doença nas plantas apareceram principalmente a nível foliar, consistindo em plantas com manchas foliares, galerias e com cloroses. Ao nível das manchas foliares, os sinais levaram a suspeitar de que se poderia tratar de uma doença de origem não patológica, que também apareceram nos ensaios que decorreram no Fitoclima. Relativamente às galerias, estas poderão estar relacionadas com a ação de larva mineira, que se encontraram ao longo das folhas observadas. Por último, as cloroses apresentadas nas folhas de algumas plantas sugeriram tratar-se de cladosporiose.

A necrose apical foi outro dos sintomas observado em várias plantas do ensaio, sendo que, a incidência destes sintomas foi generalizada nas plantas da cultivar Multifort. A causa desta necrose apical poderá ser atribuída a um golpe de calor, sendo que também se colocou a hipótese de uma infeção por *Botrytis cinerea*, no entanto, não foram detetados esporos do fungo nas observações, quer à vista desarmada, quer com o auxílio da lupa.

Relativamente às pragas detetadas, verificou-se a presença de mosca branca, tendo sido observados ovos, pupas e adultos. Foram ainda detetados à lupa, em amostras de folhas, ácaros e cigarrinhas.

#### 4. Discussão e conclusão

A utilização de enxertia em hortícolas tem tido um incremento significativo como resposta à intensificação da produção hortícola, sustentada por uma repetição anual das culturas no mesmo solo e por uma intensa utilização de fertilizantes e pesticidas de síntese, que têm provocado graves problemas ambientais e paulatinamente estão associadas a problemas de saúde humana como seja o aumento assustador de casos de cancro. Assim, os consumidores estão cada vez mais informados, mostrando um crescente interesse na eliminação de resíduos químicos de síntese nos alimentos e nos efeitos resultantes do modo de produção no ambiente, tendo em consideração a relevância da segurança alimentar. Portanto, a enxertia de plantas hortícolas apresenta-se como uma técnica de grande interesse, por ser segura para o ambiente e de fácil gestão. Em conjunto com a utilização de cultivares tolerantes, a técnica de enxertia com porta-enxertos resistentes/tolerantes representa um potencial substituto da desinfeção química do solo na produção convencional e da desinfeção por vapor no modo de produção biológico (Moreira, 2012; Mourão et al., 2012; Mourão et al., 2014 in Mourão & Brito, 2014).

Verificou-se com a realização deste ensaio que com a exceção da cv. Silex, todas as cvs. testadas foram consideradas suscetíveis a *M. incognita*, de acordo com a avaliação-padrão de Sasser et al. (1984), induzindo galhas nas raízes e conseguindo multiplicar as suas populações. A cv. Silex foi assim classificada com o grau de resistência de hipersensível. A hipersensibilidade nestes testes de reação hospedeira manifesta-se pelo desenvolvimento ao redor da região anterior dos juvenis que penetraram, ou próximo do local onde as células de alimentação poderiam ser incitadas, uma região de células necróticas, sendo desta forma essa reação designada de hipersensibilidade (Dropkin, 1969). Embora não tenham sido obtidos resultados significativos, foi encontrada ainda uma tendência geral para um menor peso fresco da parte aérea das plantas inoculadas, o que poderá denotar um pior desempenho em geral das plantas face à infeção por nemátodes.

Uma exploração aprofundada dos resultados, tendo em conta os vários indicadores, permite, no entanto, uma caracterização mais fina de reação hospedeira das várias cultivares de porta-enxerto. Em relação às cvs. testemunha, a reprodução do nemátode foi idêntica na cv. KingKong, superior na cv. Maxifort, e inferior nas restantes cvs. No entanto, nas restantes cultivares de porta-enxerto, a reprodução do nemátode nunca ultrapassou os 25% daquela obtida nas plantas utilizadas como testemunha suscetível.

Uma redução da multiplicação da população de nemátodes em  $\frac{3}{4}$  face a plantas suscetíveis deve ser positivamente avaliada na definição de estratégias de gestão de nemátodes-das-galhas radiculares.

Com exceção dos valores obtidos para a cv. Maxifort, foi registada uma tendência para um menor número de galhas e de massas de ovos nas plantas das cultivares de porta-enxerto. De facto, o menor número de galhas face às testemunhas revela que as raízes das plantas de porta-enxerto sofreram significativamente menores danos quando expostas a um mesmo nível populacional de nemátodes. Por outro lado, uma infeção mais leve permite reduzir a competição intra-específica nas raízes das plantas de porta-enxerto, criando boas condições para as fêmeas do nemátode que conseguiram estabelecer locais de alimentação. Assim, um menor número de fêmeas conseguirá obter maior sucesso reprodutivo, pelo que a fecundidade do nemátode nas cvs. porta-enxerto foi sempre em geral superior à obtida nas cvs. testemunha. Será, no entanto, de salientar que nas cvs. Multifort e Silex, onde foi observado um número de galhas menor do que o encontrado nas testemunhas, a fecundidade das fêmeas não foi superior ao dessas plantas. Assim, estas duas cultivares conjugaram menores danos nas raízes com uma supressão do sucesso reprodutivo, o que poderá mais uma vez salientar o seu potencial de resistência. Verificou-se ainda que na relação entre o peso seco da parte aérea e da radicular, esta foi idêntica quer para as plantas com inoculação quer para as sem inoculação, excetuando as cv. Money maker (testemunha) e Coração de boi, na qual a relação foi inferior nas plantas inoculadas, o que significa que estas tiveram um menor desenvolvimento da parte aérea e por consequência um maior investimento radicular, ao passo que na cv. Auroch as plantas inoculadas apresentaram uma maior relação, isto é, a parte aérea das plantas inoculadas foi superior comparativamente com as plantas não inoculadas.

Em suma, é importante sublinhar que as cultivares de porta-enxerto de tomateiro disponíveis comercialmente e referenciadas como parcialmente resistentes a *Meloidogyne* spp. poderão ser suscetíveis a estes nemátodes. É assim imperativo que seja testada a sua reação hospedeira em condições controladas para melhor avaliar a sua resistência. As cultivares de porta-enxerto testadas não foram em geral tão suscetíveis como as testemunhas positivas reconhecidamente suscetíveis, tal aponta um certo efeito positivo que poderá ser explorado com o uso combinado de rotação de culturas e outras formas de controlo que atuem satisfatoriamente sobre populações baixas de nemátodes fitoparasitas, destacando-se nomeadamente, o uso dos agentes de controlo biológico como a bactéria

*Pasteuria penetrans* ou o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Costa, 2015). A enxertia de hortícolas utilizando porta-enxertos parcialmente resistentes a NGR poderá ser útil no controlo de nemátodes em agroecossistemas, mas não tem sido suficiente para o controlo sustentável e duradouro destes nemátodes fitoparasitas. Desta forma, a utilização destes porta-enxertos acarreta um novo equilíbrio à comunidade de nemátodes, criando teoricamente alteração da espécie de nemátodes dominante. Seria expectável avaliar as consequências deste novo equilíbrio nos organismos da rizosfera e perceber os impactos nas suas interações, para que estas possam ser exploradas de uma forma favorável. É importante referir que a utilização de porta-enxertos apenas parcialmente resistentes ou tolerantes, em detrimento dos totalmente resistentes, faz sentido em teoria, porque não permite a explosão das populações de NGR, mas por outro lado também não as elimina totalmente, nunca criando um vazio ecológico que possa ser rapidamente preenchido por uma espécie agressiva (Costa, 2015).

Perspetiva-se que outros testes de reação hospedeira das cultivares de porta-enxertos avaliadas poderão melhor suportar a tomada de decisões sobre o seu uso no campo. Trabalhos futuros deverão incluir, por exemplo, a reação a outras espécies e populações de *Meloidogyne*, algumas das quais desenvolvem elevada virulência quando são cultivadas plantas como o gene Mi. A resistência a NGR conferida por este gene pode ser ultrapassada quando as plantas são expostas a temperaturas acima dos 28°C, pelo que o presente estudo poderá ser complementado com ensaios idênticos nesta gama de temperaturas. Posteriormente, as cultivares de porta-enxerto testadas deverão então ser avaliadas em condições de campo para avaliação de outros fatores que poderão afetar a sua reação hospedeira a NGR, tendo em conta ainda a reação a misturas de espécies de *Meloidogyne* e os efeitos globais no equilíbrio da atividade biológica do solo.

## Referências bibliográficas

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G., Deleury, E., Block, V. C. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature biotechnology*, New York, v. 26, n. 8, p. 909-915.
- Abrantes, I., & Santos, M. (1991). *Meloidogyne lusitanica* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing olive tree (*Olea europaea* L.). *Journal of Nematology*, 23: 210–224.
- Abrantes, I., Santos, M., Conceição, I., M.S.N, S., & Vovlas, N. (2008). Root-knot and other plant-parasitic nematodes associated with fig trees in Portugal. *Nematologia Mediterranea*, 36: 131–136.
- Almeida, D. (2006). Manual de Culturas Hortícolas. *Editorial Presença*, Volume II, 39-72.
- Amaro, P. (2003). A Protecção Integrada. *ISA/Press*, 19-30.
- Amin, A., & Mona, A. (2014). Protecting cucumber from *Meloidogyne incognita* using graft onto resistant cucurbit rootstocks and antagonistic marigold as an alternative to nematicide. *Pakistan Journal of Nematology*, 32(1): 51–58.
- Antônio, H. (1992). Fitonematoides na cultura da soja. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v. 16, n. 172, p. 60-65.
- Bardgett RD, C. R. (1999). The influence of nematodes on below-ground processes in grassland ecosystems. *Plant and Soil*, 212:23–33.
- Barker, K., & Koenning, S. (1998). Developing sustainable systems for nematode management. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 165-205.
- Barker, K., & Koenning, S. (1998). Developing sustainable systems for nematode management. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 165–205.
- Barros, A., Moura, R., & Pedrosa, E. (2000). Aplicação de terbufós no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zeae* em cinco variedades de cana-de-açúcar no Nordeste. Parte 1 - Efeitos na cana planta. *Nematologia Brasileira*, v. 24, n. 1, p.73-78.
- Bedendo, I. P. (2011). Ambiente e doença. Em A. Bergamin Filho, H. Kimati, & L. Amorim, *Manual de fitopatologia* (pp. p. 331-341). 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres.
- Bernard, E. (1992). Soil nematode biodiversity. *Biology and Fertility of Soils*, 14: 99–103.
- Bird, D., & Opperman, C. (1998). *Caenorhabditis elegans*: A genetic guide to parasitic nematode biology. *Journal of Nematology*, 30: 299–308.
- Blaxter, M. (2011). Nematodes: the worm and its relatives. *PLoS Biology*, 9: 1–9.
- Boag, B., & Yeates, G. (1998). Soil nematode biodiversity in terrestrial ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, 7: 617–630.
- Bogoescu, M., Doltu, M., Iordache, B., Tanasa, N., Sora, D., & Mohora, A. (2010). Grafting Watermelons Crop- Non chemical Methyl Bromide Alternative in Romanian Horticulture. *Bucharest, Romania: Research and Development*.

- Institute for Processing and Marketing of the Horticultural Products. Bulletin UASVM Horticulture*, 67(1). 1843-5394.
- Boneti, J. I., Ferraz, S., & Oliveira, L. M. (1982). Influência do parasitismo de *Meloidogyne exigua* sobre a absorção de micronutrientes (Zn, Cu, Fe Mn e B) e sobre o vigor de mudas de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira, Brasília*, v. 7, n. 1, p. 197-207.
- Bongers, T. (1990). The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 83: 14–19.
- Bourne, J., Kerry, B., & De, L. F. (1996). The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6, 539-548.
- Brandão, J., Goto, R., Guimarães, V., Habermann, G., Rodrigues, J., & Callegari, O. (2003). Influência da enxertia nas trocas gasosas de dois híbridos de beringela. *Brasil: Horticultura Brasileira, Brasília*, v.21 n°3,p. 474-477.
- Cabanillas, E., & Barker, K. R. (1989). Impact of *Paecilomyces lilacinus* inoculum level and application time on control of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Journal of Nematology, College Park*, v. 21, n. 1, p. 115-120.
- Campos, V., Campos, J., Silva, L., & Dutra, M. (2002). Manejo de doenças causadas por nematóides em frutíferas. Em L. (. Zambolim, *Manejo integrado: fruteiras tropicais, doenças e pragas* (pp. p.185-238). Viçosa, MG: UFV; Suprema.
- Canto-Saenz, M. (1983). The nature of resistance to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood 1949. Em *Proceedings, Third Research and Planning Conference on Root-Knot Nematodes, Meloidogyne* spp. (pp. 160-165). March 22-26, 1982, C. C. Carter (Ed), International Meloidogyne Project. Lima, Peru: North Carolina University Graphics.
- Carneiro, R., Mazzafera, P., & Ferraz, L. (1999). Carbon partitioning. Em *Soybean infected with Meloidogyne incognita and M. javanica* (pp. Journal of Nematology 31: 348–355).
- Castagnone-Sereno, P. (1994). Genetics of *Meloidogyne* virulence against resistance genes from Solanaceous crop. Em L. F, D. C. De Giorgi, & B. McK, *Advances in Molecular Plant Nematology* (pp. 261–276). Plenum Press, NY,USA,.
- Castagnone-Sereno, P., & Danchin, E. (2014). Parasitic success without sex: the nematode experience. *Journal of Evolutionary Biology*, 27: 1323-1333.
- Charchar, J. (1995). Meloidogyne em hortaliças. Em *Congresso Internacional de Nematologia Tropical*, 27 (pp. p. 149-153, 1995). Rio Quente.
- Chen, Z., & Dickson, D. (1998). Review of Pasteuria penetrans: biology, ecology, and biological control potential. *Journal of nematology*, 30:313-340.
- Chitwood, B. (1949). Root-knot nematodes – Part I, A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 16: 90–104.
- Chitwood, B., & Chitwood, M. (1937). *An Introduction to Nematology*, Baltimore, MD: Monumental Printing.



- Colyer, P., Kirkpatrick, T., Vernon, P., & Barham, J. (1998). Reducing *Meloidogyne incognita* injury to cucumber in a tomato-cucumber double-cropping system. *Journal of Nematology*, 30, 226-231.
- Conceição, I. d., Correia, M., Vieira dos Santos, M., Abrantes, I. d., & Santos, M. d. (2009). Root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., on potato in Portugal. *Nematology*, 11: 311-313.
- Consortium, C. e. (1998). *Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology*. 282: 2012–2018: Science.
- Costa, J. M., & Heuvelink, E. (2005). Introduction: The tomato crop and industry. Em E. Heuvelink, *Tomatoes* (pp. 1-20). Cambridge: CABI Publishing.
- Costa, S. (2014). Ecologia de nemátodes e seu interesse na enxertia de plantas hortícolas (Parte I/II). *Agrotec- Revista técnico-científica agrícola*, 29.
- Costa, S. (2015). Ecologia de nemátodes e seu interesse na enxertia de plantas hortícolas (Parte II/II). Em *Agrotec – Revista técnico-científica agrícola* (pp. 14: 28–30).
- Costa, S., & Freitas, H. (2011). Invasão Biológica: a perspetiva do solo. *Atas do 62º Congresso Nacional de Botânica, Brasil*, 315-317.
- Costa, S., Freitas, H., & Mathesius, U. (2008). Interactions between nematodes and rhizobia: from proteomics to plant distribution. *5th international congress of nematology, Brisbane*.
- Costa, S., Kerry, B., Bardgett, R., & Davies, K. (2006). Exploitation of immunofluorescence for the quantification and characterization of small numbers of *Pasteuria* endospores. *Federation European Microbiological Societies*, 593-595.
- Costa, S., Kerry, B., Bardgett, R., & Davies, K. (2012). Interactions between nematodes and their microbial enemies in coastal sand dunes. *Oecologia*, 170: 1053-1066.
- Coyne, D., Nicol, J., & Claudius-Cole, B. (2007). Nematologia prática: Um guia de campo e de laboratório. *SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou: Benin*.
- Dam, V., Goffau, M. H., Jeude, J., & Naika, S. (2005). A cultura de tomate. Produção, processamento e comercialização. Agromisa/CTA. Site disponível: <http://umaquintanacidade.files.wordpress.com/2012/02/a-cultura-do-tomate.pdf>.
- Decraemer, W., & Hunt, D. (2006). Structure and classification. Em R.N, & M. M. Perry, *Plant Nematology* (pp. 3–32). Wallingford, Oxfordshire: CAB International.
- DeVay, J. (1991). Historical review and principles of soil solarization. Em J.E, J. DeVay, Stapleton, C.L, & Elmore (Eds.), *Soil Solarization*. Rome: FAO.
- Devran, Z., Alİ Söğüt, M., & Mutlu, N. (2010). Response of tomato rootstocks with the Mi resistance gene to *Meloidogyne incognita* race 2 at different soil temperatures. *Phytopathol. Mediterr*, 49, 11–17.
- Dgav. (2016). Guia dos produtos fitofarmacêuticos, Lista dos produtos com venda autorizada. *Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, Direção de alimentação e veterinária; Direção de Serviços de Meios de Defesa Sanitária; Divisão ge Gestão e autorização de produtos fitofarmacêuticos*, 29-30.
- Dgav. (2017). [http://www.dgav.pt/fitofarmaceuticos/guia/finalidades\\_guia/Outros/Nematodidicid](http://www.dgav.pt/fitofarmaceuticos/guia/finalidades_guia/Outros/Nematodidicid)

- as/tomateiro2.htm. *Produtos fitofarmacêuticos, Condições de utilização, Nematodocidas, Tomateiro (Substâncias activas homologadas)*.
- Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., & Harder, W. (1994). Ultrastructural study of adhesion and initial stages of infection of nematodes by conidia of *Drechmeria coniospora*. *Mycological Research, Cambridge*, v. 94, n. 1, p. 1-8.
- Dropkin, V. (1969). The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology, St. Paul*, v. 59, n. 11, p. 1632-1637.
- Eisenback, J., & Triantaphyllou, H. (1991). Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Em *Manual of Agricultural Nematology* (pp. 191-274). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Emmert, E., & Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters, Amsterdam*, v. 171, n. 1, p. 1-9.
- Ettema, C., & Bongers, T. (1993). Characterization of nematode colonization and succession in disturbed soil using the Maturity Index. *Biology and Fertility of Soils*, 16: 79-85.
- Fancelli, M. (2003). Resistência e alternativas de controle de pragas. Em *Simpósio Brasileiro sobre bananicultura, 5., Workshop do genoma Musa, 1., 2003*. (pp. p. 127-133). Paracatu. Anais...Cruz das Almas: Gráfica e Editora Nova Civilização.
- FAO. (2014). *Food and Agricultural Organization of the United Nations. Commodities production*. Obtido de FAOSTAT: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Ferraz, L., & Monteiro, A. (2011). Nematoides. Em L. Amorim, H. Kimati, & A. Bergamin, *Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos* (pp. 168-199). 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Ferraz, L., Asmus, G., Carneiro, R., Mazaffera, P., & Silva, J. (2001). As Meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. *elações Parasito-Hospedeiro nas Meloidoginoses da Soja*, 15-38.
- Ferris, H., Venette, R., & Scow, K. (2004). Soil management to enhance bacterivore and fungivore nematode populations and their nitrogen mineralization function. *Applied Soil Ecology*, 24: 19-35.
- Ferris, H., Venette, R., van der Meulen, H., & Lau, S. (1998). Nitrogen mineralization by bacterial-feeding nematodes: verification and measurement. *Plant and Soil*, 203: 159-171.
- FiBL. (2000). Results from a 21 year old field trial. FiBL dossier 1.
- Fierer, N., Strickland, M., Liptzin, D., Bradford, M., & Cleveland, C. (2009). Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters*, 12: 1-12.
- FLF. (2010). Plantas enxertadas conquistam Portugueses. *Frutas, Legumes e Flores*, 110, p.40-41.
- Franzener, G. (2005). *Proteção de tomateiro a Meloidogyne incognita pelo extrato aquoso de Tagetes patula*. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel: 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitotecnia).
- Freire, E. (2015). *Tuta absoluta: uma das pragas mais agressivas na cultura do tomate*. *Vida Rural*, consultado em <https://www.vidarural.pt/insights/tuta-absoluta-uma-das-pragas-mais-agressivas-na-cultura-do-tomate/>.

- Freire, F. C., & Bridge, J. (1985). Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 10, n. 1, p. 577-596.
- Freitas, I. G., Oliveira, R. D., & Ferraz, S. (2001). *Introdução à nematologia*, Viçosa: UFV, p.84.
- Freitas, M. A., Pedrosa, E. M., Mariano, R. L., & Maranhão, S. R. (2012). Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes para biocontrole de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. *Nematropica*, Bradenton, v. 42, n. 1, p. 115-122.
- Gilbert, J. C., & Mcguire. (1956). Inheritance of resistance to severe root-knot from *M. incognita* in commercial-type tomatoes. *American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 68, n. 1, p. 437-442.
- Goeldi, E. (1892). Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 8: 7–123.
- Goettel, M. S., Hajjek, A. E., Siegel, J. P., & Evans, H. C. (2001). Safety of fungal biocontrol agents. Em T. M. BUTT, C. JACKSON, & N. MAGAN, *Fungi as biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* (pp. cap. 13, p. 347-376). United Kingdom: CABI Publishing.
- González, J. (1999). El Injerto en Hortalizas. *España: Ed. Horticultura*, 140.
- Goodey, B., Franklin, M., & Hooper, D. (1965). *The Nematode Parasites of Plants Classified Under Their Hosts*, Farnham Royal, UK: CAB International.
- Goto, R. (2003). Enxertia em Hortaliças. *São Paulo, Brasil: UNESP*.
- Graham, R., & Webb, M. J. (1991). Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. Em J. J. Mortvedt, F. R. Cox, L. M. Shuman, & R. M. Welch, *Micronutrients in agriculture* (pp. p. 329-370). 2. ed. Maidson: Soil Science Society of America.
- Hadisoeganda, W., & Sasser, J. (1982). Resistance of tomato, bean, southern pea, and garden pea cultivars to root-knot nematodes based on host suitability. *Plant Disease*, 66: 145–150.
- Hallman, J., Frankenberg, A., Paffrath, A., & Schmidt, H. (2007). Occurrence and importance of plant-parasitic nematodes in organic farming. Em *Nematology* (pp. 9: 869–879). Germany.
- Hanna, H. (2000). Double-cropping muskmelons with nematode resistant tomatoes increases yield, but mulch color has no effect. *Hortscience*, 35, 1213–1214.
- Hartman, K. (1983). Enhancement technique for egg masses of the root-knot nematode with phloxine B. Em *Proc. Third Res. & Plann. Conf. on Root-knot Nematodes, Meloidogyne spp., March 22-26, 1982, ed. C. C. Carter. International Meloidogyne Project, Lima, Peru. 233PP.* (p. 130).
- Hodda, M., Bloemers, G., Lawton, J., & Lamshead, P. (1997). The effects of clearing and subsequent land-use on abundance and biomass of soil nematodes in tropical forest. *Pedobiologia*, 41: 279–294.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease, St. Paul*, v. 87, n. 1, p. 4-10.

- Hoyos, E. (2000). Influencia de diferentes porta-injertos sobre la producción de pepino corto tipo español, cultivado em invernadero em la zona central española. *Horticultura Argentina (Mendoza)*, v.19,nº46,p.41.
- Hugot, J., Baujard, P., & Morand, S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3: 199–208.
- Hunt, D., & Handoo, Z. (2009). Taxonomy, identification and principal species. Em R. Perry, M. Moens, & J. Starr, *Root-knot nematodes* (pp. 55–97). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Hussey, R. (1985). Host-parasite relationships and associated physiological changes. Em *An Advanced Treatise on Meloidogyne Volume 1: Biology and Control* (pp. 143–153). Raleigh, U.S.A.: North Carolina State University Graphics.
- Ibrahim, I. (1985). The status of root-knot nematodes in the Middle East, Region VII of the International Meloidogyne Project. Em J. Sasser, & C. Carter, *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol. I: Biology and Control* (pp. 373–378). Raleigh, USA: North Carolina State University Graphics.
- INE. (2017). Estatísticas Agrícolas 2016, Edição 2017. *Instituto Nacional de Estatística*, 22-30.
- Ingham, R., Trofymow, J., Ingham, E., & Coleman, D. (1985). Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: Effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs*, 55: 119–140.
- Ioannou, N. (2001). Integrating soil solarization with grafting on resistant rootstocks for management of soil-borne pathogens of eggplant. *Journal of Horticultural Science*, 76, 396–401.
- Jones, F., & Jones, M. (1964). Plant parasitic nematodes – Nematoda. Em F. Jones, & M. (. Jones, *Pests of Field Crops* (pp. 220–241). London, UK: Edward Arnold Ltd.
- Jones, J., Haegeman, A., Danchin, E., Gaur, H., Helder, J., Jones, M., . . . Perry, R. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14: 946–961.
- Kaloshian, I., Williamson, V., G, M., D, L., & B.B, W. (1996). Resistance-breaking' nematodes indentified in California tomatoes. *California Agriculture*, 50,18–9.
- Karssen, G. (2002). The plant-parasitic nematode genus *Meloidogyne* Göldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Brill, Leiden: The Netherlands.
- Katan, J. (1980). Solar pasteurization of soils for disease control: status and prospects. *Plant Disease*, 64: 45–54.
- Kerry, B. R., Crump, D. H., & Mullen, L. A. (1982). Studies of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae* under continuous cereals, 1975-1978. II. Fungal parasitism of nematode females and eggs. *Annals of Applied Biology, London*, v. 100, n. 1, p. 489-499.
- Kerry, B., & Hominick, W. (2002). Biological control. Em D. (. Lee, *Biology of Nematodes* (pp. 483-510). London: Taylor & Francis.
- Kiewnick, S., & Sikora, R. A. (2006). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control, San Diego*, v. 38, n. 2, p. 179-187.

- Krueger, R., & McSorley, R. (2008). Nematode management in organic agriculture. *University of Florida: IFAS Extension*, p.1–9.
- Lara, J., Acosta, N., Betancourt, C., Vincente, N., & Rodríguez, R. (1996). Control biológico de *Meloidogyne incognita* en tomate en Puerto Rico. *Nematropica*, Bradenton, v. 26, n. 2, p. 143–152.
- Lee, J. (1994). Cultivation of Grafted Vegetables I. Current Status, Grafting methods, and Benefits. *Korea: Department of Horticulture, Kyung Hee University. Horticultural Science (HortScience)*, V.29(4).
- Lee, J. (2003). Current status of grafted vegetable cultivation. *Chronica Horticulturae*, 43, 13–19.
- Lee, J., & Oda, M. (2003). Grafting of herbaceous vegetable and ornamental crops. *Horticultural Reviews*, v.28, p.61–123.
- Lee, J., Kubota, C., Tsao, S., Bie, Z., Echevarria, P., Morra, L., & Oda, M. (2010). Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. *Scientia Horticulturae*, 127, p.93–105 -Review.
- Lopes, C. A., & Reis, A. (2011). Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. *Circular Técnica*, 100, 2ª Ed, Embrapa, 17.
- Lopez-Perez, J., M. Le Strange, I., Kaloshian, & A.T.Ploeg. (2006). Differential response of Mi gene-resistant tomato rootstocks to root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). *Crop Protection*, 25, 382–388.
- Mashela, P. W., Shimelis, H., & Mudau, F. (2008). Comparison of efficacy of ground wild cucumber fruits, aldicarb and fenamiphos on suppression of *Meloidogyne incognita* in tomato. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 156, n. 5, p. 264–267.
- Mathesius, U. (2003). Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes – the Rhizobium-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions. *Plant and Soil*, 255:105–119.
- Medina-Filho, H., & M.A, S. (1980). Tomato breeding for nematodes resistance: survey of resistant varieties for horticultural characteristics and genotype of acid phosphatase. *Acta Horticulturae*, 100, 383–393.
- Méndez, C. (2010). La polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick), una plaga muy agresiva. *OIRSA.México*.
- Messeguer, R., Ganal, M., Vicente, M. d., N.D. Young, H., & Tanksley, S. (1991). High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (Mi) in tomato. *Theoretical Applied Genetics*, 82, 529–536.
- Miguel, A. (1997). Injerto en hortalizas. *Espanha: Generalitat Valenciana, Conselleria*, 88.
- Mitkowski, N., & Abawi, G. (2003). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *The Plant Health Instructor*, DOI:10.1094/PHI-I-2003-0917-01.
- Monserrat. (2009). La polilla del tomate *Tuta absoluta* en la región de Murcia: Bases para su control. *Série Técnica y de Estudios nº34, Murcia*, 112.
- Mourão, I., & Brito, L. (2014). A enxertia em culturas hortícolas. Em *Agrotec – Revista Técnico-Científica Agrícola* (pp. 12: 43–46).

- Neher, D., & Campbell, D. (1994). Nematode communities and microbial biomass in soils with annual and perennial crops. *Applied Soil Ecology*, 1: 17–28.
- Neshev, G. (2007). Major soil-borne phytopathogens on tomato and cucumber in Bulgaria, and methods for their management. Em L. R, *Manual - Alternatives to replace methylbromide for soil-borne pest control in east and Central Europe* (pp. 1-22). FAO e UNEP.
- Nicol, J., Turner, S., Coyne, D., den Nijs, L., Hockland, S., & Maafi, Z. (2011). Current nematode threats to world agriculture. Em J. Jones, G. Gheysen, & C. Fenoll, *Genomics and Molecular Genetics of Plant–Nematode Interactions* (pp. 21–44). Heidelberg: Springer.
- Noling, J. (<http://edis.ifas.ufl.edu/cv112> de 1995). Nematodes and their management. *Horticulturas Sciences Department – UF/IFAS Extension*. acedido em Outubro 2017: <http://edis.ifas.ufl.edu/cv112>.
- Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., & Sorribas, F. (1997). Effect of the previous crop on population densities of *Meloidogyne javanica* and yield of cucumber. *Nematopica*, 27, 85–90.
- Peil, R. (2003). A enxertia na produção de mudas de hortaliças. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.33.nº6,p.169-177.
- Peil, R., & Gálvez, J. (1999). Cultivo del tomate con la técnica de la lámina de nutrientes (nft) en el sudeste español. *Madrid: cepla (comité español de plásticos en la agricultura): Congreso panameno, y congreso iberoamericano de aplicación de los materiales plásticos en la agricultura*, p.124-139.
- Pérez-García, A., Romero, D., & Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacillus* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology, London*, v. 22, n. 2, p. 187–193.
- Piskiewicz, A., Duyts, H., & van der Putten, W. (2008). Multiple species-specific controls of root-feeding nematodes in natural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2729–2735.
- Qiao, K., Liu, X., Wang, H., Xia, X., Ji, X., & Wang, K. (2012). Effect to abamectin on root-knot nematodes and tomato yield. *Pest Management Science, West Sussex*, v. 68, n. 6, p. 853-857.
- Rivard, C., & Louws, F. (2008). Grafting to Manage Soilborne Diseases in Heirloom Tomato Production. *Hortscience*, 43:7, 2104–2111.
- Roberts, P. A., Dalmasso, G., Cap, & P, C.-S. (1990). Resistance in *Lycopersicon peruvianum* to isolates of Mi gene compatible *Meloidogyne* populations. *Journal of Nematology*, 22, 585–589.
- Roberts, P., & Thomason, I. (1986). Variability in reproduction of isolates of *Meloidogyne incognita* and *M.javanica* on resistant tomato genotypes. *Plant Disease*, 70, 547–551.
- Rodrigues, C. (2009). Plantas hortícolas enxertadas. *I Colóquio Nacional de Sementes e Viveiros. Portugal: Atas Portuguesas de Horticultura*, 15, p.80-84.
- Sasser, J., & Carter, C. (1985). Plant-Parasitic Nematodes. Em *An Advanced Treatise on Meloidogyne Volume 1: Biology and Control* (pp. 14–53). Raleigh, U.S.A.: North Carolina State University Graphics.

- Sasser, J., Carter, C., & Hartman, K. (1984). Standardization of Host Suitability Studies and Reporting of Resistance to Root-Knot Nematodes. *Raleigh, U.S.A.: North Carolina State University Graphics*.
- Scheffers, B., Joppa, L., Pimm, S., & Laurance, W. (2012). What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 27: 501–510.
- Scholl, E., Thorne, J., McCarter, J., & Bird, D. M. (2003). Horizontally transferred genes in plant parasitic nematodes: a high-throughput genomic approach. *Genome Biology*, 4: R39.
- Sharma, R., & Gomes, A. (1996). Effect of *Bacillus* spp. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. *Nematologia Brasileira, Brasília*, v.20, n. 1, p.53- 62.
- Sikora, R. (1988). Interrelationship between plant health-promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige Rijksuniversiteit, Gent*, v. 53, n.1, p. 867-878.
- Silva, C. (2012). Nematodídeos botânicos no controlo do nemátode-das-galhas-radiculares, *Meloidogyne javanica*. *Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia – Universidade do Minho, Portugal*.
- Silva, J. B., & Giordano, L. B. (2000). Tomate para processamento industrial. Comunicação para transferência de tecnologia. *Brasília: Embrapa-CNPq*, p.169.
- Simões, J. (2005). Utilização de produtos fitofarmacêuticos na agricultura. *Principia, Publicações Universitárias e Científicas, Porto*, 104.
- Soares, P. L. (2006). Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos. 252 f. *Tese (Doutorado em Agronomia: Entomologia Agrícola)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal*.
- Sohlenius, B. (1980). Abundance, biomass and contribution to energy-flow by soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Oikos*, 34: 186–194.
- Stirling, G. (1991). Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects. *CAB International, Wallingford, UK*.
- Stone, A. (1973). *Heterodera pallida* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), a second species of potato cyst nematode. *Nematologica*, 18: 591–606.
- Taylor, A., & Sasser, J. (1978). Breeding plant cultivars for resistance to *Meloidogyne* species. Em *Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne spp.)* (pp. 37-106). Raleigh, U.S.A: North Carolina State University Graphics.
- Taylor, L., Sasser, J., & Nelson, L. (1982). *Relationships of climate and soil characteristics to geographical distribution of Meloidogyne species in agricultural soils*. Cooperative Publication, Department of Plant Pathology, North Carolina State University and US Agency for International Development, Raleigh, North Carolina.
- Terefe, M., Tefera, T., & Sakhuja, P. (2009). Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of

- tomato plants in the greenhouse and nursery. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94-99.
- Theodoropoulou, A., Giotis, C., Hunt, J., Gilroy, J., Toufexi, E., Liopa-Tsakalidis, A., Leifert, C. (2007). Effect of variety choice and use of resistant rootstock on crop yield and quality parameters of tomato plants grown in organic, low input and conventional production systems/growth media. *3rd QLIF Congress: Improving Sustainability in Organic and Low Input Food Production Systems, University of Hohenheim, Germany*.
- Timper, P., Liu, C., Davis, R., & Wu, T. (2016). Influence of crop production practices on *Pasteuria penetrans* and suppression of *Meloidogyne incognita*. *Biological Control*, 64-65.
- Triantaphyllou, A. (1973). Environmental sex differentiation of nematodes in relation to pest management. *Annual Review of Phytopathology*, 11: 441–462.
- Triantaphyllou, A., & Hirschmann, H. (1959). Development and sex determination in *Meloidogyne incognita* and intersexuality. Em *M. javanica*. *Phytopathology* (pp. 49: 552–553).
- Trudgill, D. (1997). Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? *Plant Pathology*, 46: 26–32.
- Trudgill, D., & Blok, V. (2001). Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 39:53–77.
- Trudgill, D., & Blok, V. (2001). Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 53–77.
- Trudgill, D., Bolla, G., Blok, V., Daudi, A., Davies, K., Gowen, S., Voyoukallou, E. (2000). The importance of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and factors affecting the utility of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent. *Nematologica*, 2: 823–845.
- Urbaneja, A., Vercher, R., Navarro, V., García, F., & Porcuna, J. (2007). La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma España*, 194:16-23.
- Vale, F. X., Lopes, C. A., & Alvarenga, M. A. (2013). Doenças fúngicas, bacterianas e causadas por nematoides. Em M. Alvarenga, *Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia* (p. 445). Lavras: UFLA.
- Van Gundy, S. (1985). Ecology of *Meloidogyne* spp.- emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenicity. Em J. Sasser, & C. (. Carter, *An advanced treatise on Meloidogyne. Volume I: Biology and control* (pp. 177-182). Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics.
- Wardle, D., RD, B., JN, K., Setälä H, v. d., & DH, W. (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 304:1629–1633.
- Weller, D. (1988). Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review Phytopathology, Palo Alto*, v. 26, n. 1, p. 379-407.



- Wesemael, W., & Moens, M. (2011). Screening of common bean (*Phaseolus vulgaris*) for resistance against temperate root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Wiley Online Library*, 1.
- Wesemael, W., Viaene, N., & Moens, M. (2011). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Em *Nematology* (pp. 13: 3–16). Europe.
- Whitehead, A. (1997). *Plant Nematode Control (1-12)*. New York, USA: CABI Publishing.
- Whitehead, A., & Hemmings, J. (1965). A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology*, 55: 25–38.
- Widmer, T., Mitkowski, N., & Abawi, G. (2002). Soil organic matter and management of plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, 34:289-295.
- Williams, A., Stirling, G., Hayward, A., & Perry, J. (1989). Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Journal of Applied Bacteriology*, 67:145-156.
- Williamson, V. (1998). Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 277–293.
- Williamson, V. M. (1998). Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review Phytopathology, Palo Alto*, v. 36, n. 1, p. 277-293.
- Yeates, G. (1979). Soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Journal of Nematology*, 11: 213–229.
- Yeates, G., Bongers, T., de Goede, R., Freckman, D., & Georgieva, S. (1993). Feeding habits in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology*, 25: 315–331.
- Yeates, G., Ferris, H., Moens, T., & van der Putten, W. (2009). The role of nematodes in ecosystems. Em M. W.-D. (Eds.), *Nematodes as Environmental Indicators (1–44)*. Wallingford, U.K.: CABI.
- Zambolim, L., Rodrigues, F. A., & Capucho, A. S. (2005). Resistência a doenças de plantas induzida pela nutrição mineral. Em M. Venzon, T. J. Júnior, & A. Pallini, *Controle alternativo de pragas e doenças* (p. p.185). Viçosa: EPAMIG/CTZM.
- Zasada, I., Halbrendt, J., Kokalis-Burelle, N., LaMondia, J., McKenry, M., & Noling, J. (2010). Managing nematodes without methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 311–328.

## **Anexos**

## A1- Pormenores e técnicas laboratoriais do ensaio

**A1.1**-Pré-germinação das sementes em caixas de Petri com papel absorvente, bem humedecido.



**A1.2**-Sementes de tomateiro na fase de pré-germinação.



**A1.3**-Cultivares de tomateiro em vasos de 80ml.



**A1.4**-Tomateiro com dois pares de folhas verdadeiras em vaso de 0,5l.



**A1.5-**Fitoclima 2500 EDTU- aralab.



**A1.6-** Raiz de tomateiro infetada com *Meloidogyne incognita*.



**A1.7-**Tomateiros em crescimento no interior do Fitoclima.





**A1.8-** Diferentes cultivares de tomateiro em fases de crescimento diferentes no interior do Fitoclima.



**A1.9-** Raízes imersas numa solução de Floxina B a 0,0015%.



**A1.10-** Método do tabuleiro utilizado com a finalidade de extração de J2 do solo.

